

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie



**Bc. Karolína Pokorná**

## **Interakce myšího polyomaviru s Toll-like receptory**

Interactions of mouse polyomavirus with Toll-like receptors

Diplomová práce

Školitel: Doc. RNDr. Jitka Forstová, CSc.

Konzultant: Mgr. Václav Janovec

Praha, 2017

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 2.5.2017

Podpis

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce **doc. RNDr. Jitce Forstové, CSc.**, za přijetí do laboratoře virologie, mnoho cenných rad a pomoc při sepisování této práce.

Děkuji také **Mgr. Václavu Janovcovi** za vedení experimentální práce, pomoc s jejím sepisováním a všechnen čas, který této práci věnoval.

Všem kolegům z laboratoře molekulární virologie patří velký dík za vytvoření příjemného pracovního prostředí a ochotu kdykoliv poradit či pomoci. Bětce, Zuzce a Terce děkuji za výjimečné přátelství a hodiny konverzací.

Děkuji také svým rodičům za podporu během celé doby studia.



## **Abstrakt**

Toll-like receptory (TLRs) jsou významnou rodinou receptorů přirozené imunity, které umožňují rychlé rozpoznání probíhající infekce prostřednictvím molekulárních motivů asociovaných s patogeny (PAMPs). V této práci jsme se zabývali interakcí myšího polyomaviru (MPyV) a TLRs buněk myších embryonálních fibroblastů (MEF). Pozorovali jsme, že inhibice signalizace z TLR4 inhibuje odpověď buněk MEF na MPyV. Tato skutečnost naznačila, že TLR4 se podílí na rozpoznání MPyV buňkami MEF. Odpověď buněk na infekci MPyV byla zjišťována měřením koncentrace IL-6 v médiu odebraném z buněk metodou ELISA.

Následně jsme testovali, jak inhibice signalizace z TLR4 ovlivní infekci MPyV. Inhibice TLR4 signalizace inhibitorem CLI-095 neovlivnila počet infikovaných buněk. Přítomnost antagonisty TLR4 LPS-RS vedla ke snížení počtu infikovaných buněk MEF 20 hodin po infekci. Stejně tak byl pokles počtu infikovaných buněk pozorován v přítomnosti LPS.

Virová infekce byla inhibována rovněž antagonistou TLR9 ODN 2088.

Dále jsme se zabývali rolí MAP kináz v infekci MPyV. Sledovali jsme, zda inhibice zvolených MAP kináz ovlivní počet buněk infikovaných MPyV. Zatímco inhibice kinázy p38 neměla na infekci vliv, inhibice kinázy MEK nebo JNK vedla k poklesu počtu infikovaných buněk.

**Klíčová slova:** myší polyomavirus, Toll-like receptory, TLR4, TLR9, nespecifická imunita, vrozená imunita, MAP kinázy, MAPK

## **Abstract**

Toll-like receptors (TLRs) are important receptor family of innate immunity. They enable fast recognition of infection through so called pathogen associated molecular patterns (PAMPs). In this thesis, we studied interaction of mouse polyomavirus (MPyV) with TLRs of mouse embryonic fibroblasts (MEF cells). We observed that inhibition of TLR4 signaling abolished response of MEF cells to MPyV. This suggested that TLR4 plays a role in MEF cells recognition of MPyV. To detect response of MEF cell to MPyV, we measured IL-6 production by ELISA.

Next, we investigated effect of TLR4 signalization on MPyV infection. Inhibition of TLR4 signaling with CLI-095 inhibitor did not affect number of infected cells. Presence of TLR4 antagonist, LPS-RS, led to significant decrease in quantity of infected cells 20 hours post infection. Decrease in number of infected cells was also observed in presence of LPS.

Viral infection was also inhibited by TLR9 antagonist ODN 2088.

We also investigated role of MAP kinases in MPyV infection. We tested, whether inhibition of selected MAP kinases would affect number of infected cells. Inhibition of kinase p38 did not affect infection. On the other hand, inhibition of MEK kinase or JNK resulted in decrease of number of cells infected by MPyV.

**Key words:** mouse polyomavirus, Toll-like receptors, TLR4, TLR9, innate immunity, MAP kinases, MAPK

## Seznam použitých zkratk

|                 |  |
|-----------------|--|
| <b>BSA</b>      | bovinní sérový albumin                                     |
| <b>cDNA</b>     | komplementární DNA   |
| <b>CpG DNA</b>  | sekvence obsahující nemethylované CpG dinukleotidy         |
| <b>DAPI</b>     | 4,6-diamino-fenyldiol dichlorid                            |
| <b>DMEM</b>     | Dulbecco's modified eagle's medium                         |
| <b>DMSO</b>     | dimethylsulfoxid   |
| <b>dNTP</b>     | deoxynukleotidys   |
| <b>dsDNA</b>    | dvouvláknová DNA   |
| <b>EDTA</b>     | ethylendiamintetraacetát disodný                           |
| <b>ER</b>       | endoplazmatické retikulum                                  |
| <b>GAPDH</b>    | glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza                       |
| <b>HGPRT</b>    | hypoxantin-guanin fosforibosyltransferáza                  |
| <b>HPyV</b>     | lidské polyomaviry   |
| <b>HSP</b>      | Protein teplotního šoku                                    |
| <b>HSV-2</b>    | herpes simplex typu 2                                      |
| <b>IL</b>       | interleukin  |
| <b>LBP</b>      | LPS vazebný protein  |
| <b>LPS</b>      | lipopolysacharid   |
| <b>LT</b>       | velký T antigen  |
| <b>MAP</b>      | mitogenem aktivované proteinkinázy                         |
| <b>(kinázy)</b> |  |
| <b>MAPK</b>     | MAP kinázy   |
| <b>MCPyV</b>    | polyomavirus karcinomu Merkelových buněk                   |
| <b>MD-2</b>     | myeloidní diferenciační faktor 2                           |
| <b>MEF</b>      | buňky myších embryonálních fibroblastů                     |
| <b>(buňky)</b>  |  |
| <b>miRNA</b>    | <i>microRNA</i>  |
| <b>MMTV</b>     | mouse mammary tumor virus; virus myšího tumoru prsní žlázy |
| <b>MOI</b>      | multiplicita infekce                                       |
| <b>MPyV</b>     | myší polyomavirus  |
| <b>mRNA</b>     | mediátorová RNA  |
| <b>MT</b>       | střední T antigen  |

|                           |  |
|---------------------------|--|
| <b>NA</b>                 | nukleové kyseliny  |
| <b>ND</b>                 | nebylo detekováno  |
| <b>PAMPs</b>              | molekulární motivy asociované s patogeny   |
| <b>pDC</b>                | plazmacytoidní dendritické buňky   |
| <b>PI3K</b>               | fosfatidilinositol 3 kináza  |
| <b>PRRs</b>               | <i>pattern recognition receptors</i> , receptory rozpoznávající molekulové vzory |
| <b>qPCR</b>               | kvantitativní PCR  |
| <b>RSV</b>                | respirační syncytiální virus   |
| <b>S (fáze)</b>           | syntetická fáze  |
| <b>SDS</b>                | dodecylsírán sodný   |
| <b>SDS-PAGE</b>           | denaturační polyakrylamidová elektroforéza                                       |
| <b>ST</b>                 | střední T antigen  |
| <b>SV40</b>               | virus SV40; resp. opičí virus 40   |
| <b>TEMED</b>              | tetramethyldiamin  |
| <b>TLR</b>                | Toll-like receptor   |
| <b>TLR9<sup>-/-</sup></b> | Buňky s odstraněním Toll-like receptoru 9  |
| <b>(buňky)</b>            |  |
| <b>TLRs</b>               | Toll-like receptory  |
| <b>TRIS</b>               | tris(hydroxymethyl)aminomethan   |
| <b>VLPs</b>               | viru podobné částice   |
| <b>wt</b>                 | wild type, běžný typ   |

## Obsah

|   |    |
|---|----|
| 1 Úvod .....  | 10 |
| 2 Přehled literatury .....  | 11 |
| 2.1 Myší polyomavirus .....   | 11 |
| 2.1.1 Čeleď Polyomaviridae .....                                      | 11 |
| 2.1.2 Stavba virionu MPyV .....                                       | 12 |
| 2.1.3 Viru podobné částice .....                                      | 13 |
| 2.1.4 Organizace genomu MPyV .....                                    | 14 |
| 2.1.5 Replikační cyklus MPyV .....                                    | 15 |
| 2.1.5.1 Vstup viru do buňky a transport do jádra .....                | 15 |
| 2.1.5.2 Časná transkripce MPyV .....                                  | 16 |
| 2.1.5.3 Morfogeneze virionů .....                                     | 17 |
| 2.2 Toll-like receptory .....   | 18 |
| 2.2.1 Receptory nespecifického imunitního systému .....               | 18 |
| 2.2.2 Struktura a funkce TLRs .....                                   | 18 |
| 2.2.3 Toll-like receptor 4 (TLR4) .....                               | 19 |
| 2.2.3.1 Viry a TLR4 .....   | 21 |
| 2.2.3.2 MPyV a TLR4 .....   | 23 |
| 2.2.4 Toll-like receptor 9 (TLR9) .....                               | 23 |
| 2.2.4.1 Viry a TLR9 .....   | 25 |
| 2.3 Polyomaviry a MAPK .....  | 25 |
| 2.3.1 MAP kinázy .....  | 25 |
| 2.3.2 Role MAPK v životním cyklu lidských polyomavirů .....           | 25 |
| 2.3.3 MAPK a myší polyomavirus .....                                  | 26 |
| 3 Cíle práce .....  | 27 |
| 4 Materiál a metody .....   | 28 |
| 4.1 Materiály .....   | 28 |
| 4.1.1 Seznam použitých chemikálií a enzymů (s uvedením výrobce) ..... | 28 |
| 4.1.2 Buněčné linie .....   | 29 |
| 4.1.3 Viry .....  | 29 |
| 4.1.4 Vektory .....   | 29 |
| 4.1.5 Média pro tkáňové kultury .....                                 | 29 |
| 4.1.6 Složení nejčastěji používaných roztoků .....                    | 30 |
| 4.1.7 Primery .....   | 30 |
| 4.1.8 Standardy molekulových hmotností .....                          | 30 |
| 4.1.9 Protilátky .....  | 31 |
| 4.1.9.1 Primární protilátky .....                                     | 31 |
| 4.1.9.2 Sekundární protilátky .....                                   | 31 |
| 4.1.10 Komerční soupravy .....  | 32 |
| 4.1.11 Použitý software .....   | 32 |
| 4.2 Metody .....  | 33 |
| 4.2.1 Práce s tkáňovými kulturami .....                               | 33 |
| 4.2.1.1 Kultivace myších buněk 3T6 a MEF .....                        | 33 |

|   |    |
|---|----|
| 4.2.1.2 Kultivace hmyzích buněk Sf9 .....   | 33 |
| 4.2.1.3 Pasážování myších buněk 3T6 a MEF .....   | 33 |
| 4.2.1.4 Pasážování hmyzích buněk Sf9 .....  | 33 |
| 4.2.1.5 Synchronizace buněk MEF .....   | 34 |
| 4.2.1.6 Infekce (nesynchronizovaných) myších buněk MPyV .....   | 34 |
| 4.2.1.7 Infekce synchronizovaných buněk MEF MPyV .....  | 34 |
| 4.2.1.8 Infekce buněk Sf9 rekombinantním bakulovirem .....  | 34 |
| 4.2.1.9 Nepřímá imunofluorescence .....   | 35 |
| 4.2.2 Práce s DNA a RNA .....   | 35 |
| 4.2.2.1 Agarózová elektroforéza .....   | 35 |
| 4.2.2.2 Izolace RNA z buněk .....   | 36 |
| 4.2.2.3 Měření koncentrace RNA .....  | 36 |
| 4.2.2.4 Přepis RNA do cDNA .....  | 36 |
| 4.2.2.5 PCR .....   | 37 |
| 4.2.2.6 Kvantitativní PCR (qPCR) .....  | 37 |
| 4.2.3 Práce s proteiny .....  | 38 |
| 4.2.3.1 Měření koncentrace proteinů metodou Bradfordové .....   | 38 |
| 4.2.3.2 Příprava buněčného lyzátu .....   | 39 |
| 4.2.3.3 Denaturační polyakrylamidová elektroforéza (SDS-PAGE) .....   | 39 |
| 4.2.3.4 Barvení polyakrylamidového gelu po SDS-PAGE .....   | 40 |
| 4.2.3.5 Western blot .....  | 41 |
| 4.2.3.6 Dot blot .....  | 41 |
| 4.2.3.7 Imunologická detekce proteinů imobilizovaných na membráně .....                                       | 41 |
| 4.2.3.7.1 Navázání protilátek .....   | 41 |
| 4.2.3.7.2 Vizualizace signálu vyvoláním na rentgenový film nebo pomocí přístroje<br>Amersham Imager 600 ..... | 42 |
| 4.2.4 Izolace myšího polyomaviru .....  | 43 |
| 4.2.4.1 Příprava a infekce buněk .....  | 43 |
| 4.2.4.2 Centrifugace přes sacharózový polštář .....   | 43 |
| 4.2.4.3 Izopyknická centrifugace v CsCl gradientu .....   | 44 |
| 4.2.4.4 Dialýza .....   | 44 |
| 4.2.4.5 Určení infekčního titru pomocí imunofluorescence .....  | 45 |
| 4.2.4.6 Hemaglutinační test .....   | 45 |
| 4.2.4.7 Elektronová mikroskopie a negativní barvení .....   | 46 |
| 4.2.5 Izolace VP1 VLPs .....  | 46 |
| 4.2.5.1 Příprava nekoncentrované suspenze VP1 VLPs .....  | 47 |
| 4.2.5.2 Příprava koncentrované suspenze VP1 VLPs .....  | 47 |
| 4.2.6 Izolace VP1/VP3 VLPs .....  | 47 |
| 4.2.6.1 Transfekce buněk 3T6 metodou nukleofekce .....  | 47 |
| 4.2.6.2 Izolace viru podobných částic .....   | 48 |
| 4.2.7 ELISA .....   | 48 |
| 5 Výsledky .....  | 50 |
| 5.1 Izolace MPyV .....  | 50 |
| 5.2 Izolace VP1 VLPs .....  | 55 |

|  |    |
|--|----|
| 5.3 Izolace VP1/3 VLPs z buněk 3T6 .....                                     | 61 |
| 5.4 Interakce MPyV s Toll-like receptory .....                               | 66 |
| 5.4.1 Ověření aktivace signalizace z TLR4 a TLR9 pomocí metody ELISA.....    | 66 |
| 5.4.2 Odpověď buněk MEF na myší polyomavirus .....                           | 67 |
| 5.4.3 Vliv TLR4 na infekci MPyV .....  | 70 |
| 5.4.4 Odpověď buněk MEF na VLPs .....  | 72 |
| 5.4.5 Stanovení aktivace signalizace z TLR9 metodou kvantitativní PCR .....  | 76 |
| 5.4.5.1 Příprava a ověření primerů proti IL-6 .....                          | 76 |
| 5.4.5.2 Stanovení signalizace z TLR9 v buňkách MEF .....                     | 78 |
| 5.4.6 Detekce odpovědi buněk MEF na MPyV pomocí qPCR.....                    | 79 |
| 5.4.7 Vliv ODN 2088 na infekci MPyV .....                                    | 81 |
| 5.5 Vliv inhibitorů MAP kinázových signalizačních drah na infekci MPyV ..... | 83 |
| 6 Diskuze .....  | 87 |
| 7 Souhrn.....  | 97 |
| 8. Seznam použité literatury .....   | 98 |

# 1 Úvod

Od objevu myšího polyomaviru (MPyV) uplynulo již více než 50 let. Od té doby se polyomaviry staly významnými modelovými organizmy molekulární biologie. Zejména studium polyomavirů SV40 (simian virus 40) a MPyV přineslo řadu poznatků nejen v oblasti nádorové transformace.

Nový význam získalo studium čeledi *Polyomaviridae* po objevu prvních dvou lidských polyomavirů (HPyV) v roce 1971. Od té doby již bylo popsáno více než deset různých HPyV. Infekce lidskými polyomaviry je zpravidla asymptomatická, ale za určitých podmínek – zejména u imunosuprimovaných jedinců – mohou HPyV způsobit závažná onemocnění. V roce 2008 byl navíc objeven první HPyV, u kterého bylo prokázáno, že vyvolává nádorové onemocnění, polyomavirus karcinomu Merkelových buněk (MCPyV). Tento virus je spojován s karcinomem Merkelových buněk, vzácným, ovšem velmi agresivním typem rakoviny kůže. Polyomaviry jsou ve středu zájmu řady výzkumných skupin i díky jejich možnému využití v biomedicíně. Strukturní protein polyomavirů VP1 má schopnost samovolně se uspořádat do útvarů podobných kapsidám virionů. Tyto viru podobné částice (VLPs) mohou být využity například při vakcinaci, diagnostice nebo při dopravě látek do buněk.

Vzhledem k asociaci polyomavirů s lidskými nemocemi i z hlediska možného využití VLPs v medicíně je důležité porozumět interakcím polyomavirů s imunitním systémem. V této práci jsme se zabývali interakcí MPyV s Toll-like receptory (TLRs), významnou rodinou receptorů přirozené imunity, které rozpoznávají molekulární vzory asociované s patogeny. Zajímalo nás, zda v hostitelských myších embryonálních fibroblastech (MEF) může docházet k rozpoznání MPyV prostřednictvím TLRs a jak tato interakce ovlivní virovou infekci.



## 2 Přehled literatury

### 2.1 Myší polyomavirus

#### 2.1.1 Čeleď Polyomaviridae

Myší polyomavirus se řadí do čeledi *Polyomaviridae*. Tato čeleď sdružuje malé neobalené viry, jejichž genom je tvořen kruhovou dvouvláknovou DNA (dsDNA) o velikosti přibližně 5 kb.

Prvním objeveným zástupcem čeledi *Polyomaviridae* byl právě myší polyomavirus. V literatuře byl poprvé zmíněn v roce 1953, kdy bylo popsáno, že pokud je nebuněčný filtrát získaný z myši s leukémií subkutánně injikován do zdravých novorozenečným myším, vyvolává u těchto myším tvorbu nádorů (Gross, 1953). Autor tohoto objevu popsal, že filtrát obsahuje neznámé tumorogenní činidlo, které způsobilo vznik nádoru. Na Grossův výzkum v následujících letech navázali další vědci a brzy byla získána řada poznatků o myším polyomaviru a jeho interakci s hostitelskými buňkami (Sachs & Winocour, 1959; Vogt & Dulbecco, 1960).

Další polyomavirus byl objeven v roce 1960. Byl jím virus SV40 infikující primáty, který byl nalezen jako kontaminace v buňkách užívaných pro přípravu vakcíny proti dětské obrně. (Sweet & Hilleman, 1960)

Jak MPyV tak SV40 jsou malé „jednoduché“ viry, které lze snadno pomnožit v tkáňové kultuře a izolovat, a které účinně navozují nádorovou transformaci u hlodavců. Díky těmto vlastnostem se oba tyto viry staly významnými modely v oblasti nádorové biologie. Zejména virus SV40 přispěl k objevení řady faktorů, které hrají roli v nádorové přeměně. (Shrnuto v Atkin *et al.*, 2009)

Nový význam získalo studium polyomavirů v roce 1971, kdy byly objeveny první dva lidské polyomaviry – JC virus a BK virus. Zatímco JC virus byl poprvé izolován z tkáně pacienta trpícího progresivní multifokální leukoencefalopatií (Padgett *et al.*, 1971), BK virus byl poprvé popsán u pacienta se zdravotními komplikacemi po transplantaci ledvin (Gardner *et al.*, 1971). Objevy nových lidských polyomavirů pokračovaly i v následujících letech a hned několik různých polyomavirů bylo nalezeno ve vzorcích, které byly získány od pacientů trpících různými nemocemi, ale i od zdravých jedinců. Studie sledující séroprevalenci navíc ukázaly, že i když nemoci asociované s lidskými polyomaviry jsou poměrně vzácné, infekce těmito viry je naopak relativně běžná. Vědci dosud neznají všechny faktory, které vedou k propuknutí onemocnění spojených s infekcí HPyV, předpokládají ale, že významnou roli hraje zejména imunosuprese. (Shrnuto v White *et al.*, 2013)

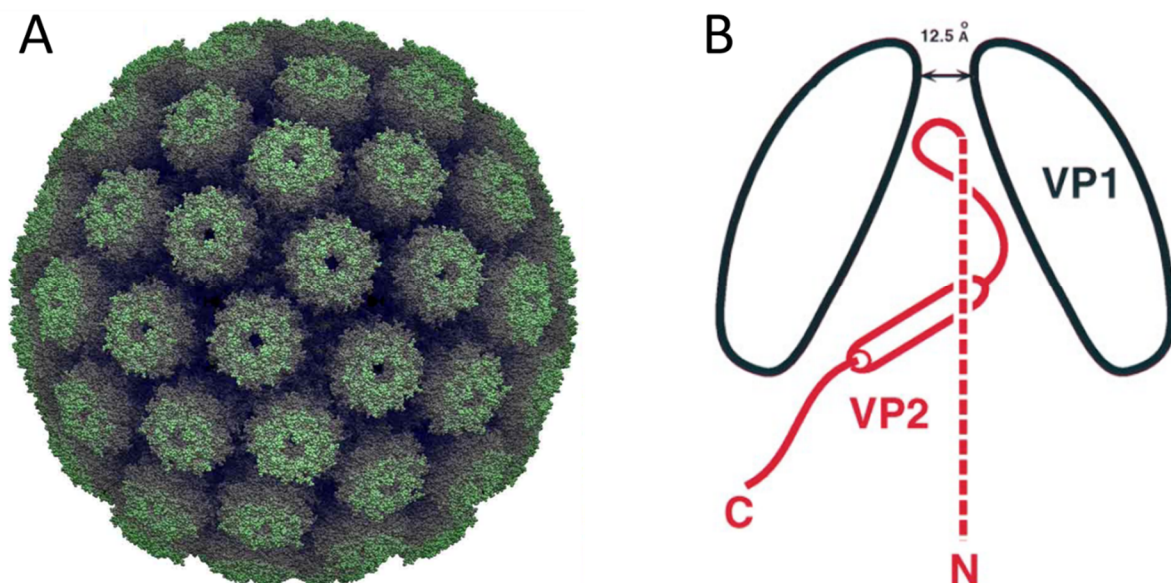
S ohledem na dříve popsané tumorogenní vlastnosti zvířecích polyomavirů si vědci kladli otázku, zda může některý z polyomavirů způsobit vznik rakovinového bujení i u lidí. Tato otázka byla o to palčivější, že vakcína kontaminovaná virem SV40 byla podána milionům lidí. Jak ovšem přehledně shrnuli Butel a Lednický (1999), navzdory popsaným nálezům sekvence genomu SV40 v lidských nádorech, chybí důkaz, že tento virus způsobuje rakovinu i u lidí. Prvním popsaným lidským onkogenním polyomavirem se tak stal až polyomavirus karcinomu Merkelových buněk popsaný v roce 2008. Tento virus byl objeven při studiu transkriptomu buněk vzácného typu rakoviny kůže, karcinomu Merkelových buněk. Bylo zjištěno, že virus je v buňkách klonálně integrován, což naznačilo, že infekce a integrace předcházela transformaci buněk. (Feng *et al.*, 2008) Přítomnost viru byla potvrzena až v 80 % nádorů tohoto typu (Sihto *et al.*, 2009) a byla popsána řada mechanismů, kterými virové proteiny ovlivňují regulaci buněčného cyklu hostitelské buňky (Borchert *et al.*, 2014; Houben *et al.*, 2010; Cheng *et al.*, 2013).

Je možné, že další polyomaviry spojené s lidskými nemocemi dosud čekají na své objevení. Rozšiřování čeledi *Polyomaviridae* totiž pokračuje i v současnosti. Metody sekvenace DNA a analýzy genomových sekvencí umožnily popsání celé řady dosud neznámých polyomavirů. V posledních deseti letech tak bylo objeveno asi třikrát více nových polyomavirů, než jich bylo popsáno během předchozích 50 let jejich studia. Mezi těmito nově objevenými polyomaviry najdeme viry infikující nejrozumnější živočichy od pavouků až po primáty. U řady z těchto virů ale známe pouze jejich hostitele a genomovou sekvenci. (Buck *et al.*, 2016; Calvignac-Spencer *et al.*, 2016)

### **2.1.2 Stavba virionu MPyV**

Virion myšího polyomaviru je tvořen kapsidou s ikosahedrální symetrií, ve které je zabalena virová dsDNA navázaná na buněčné histony. Velikost virové částice je 45 nm.

Povrch kapsidy MPyV tvoří 72 pentamerů hlavního virového strukturního proteinu VP1 (45 kDa) (Obrázek 1A). Celkem tak kapsida obsahuje 360 kopií tohoto proteinu. (Liddington *et al.*, 1991; Rayment *et al.*, 1982) Kromě VP1 se na stavbě virionu podílí ještě dva strukturní proteiny myšího polyomaviru: minoritní proteiny VP2 (35 kDa) a VP3 (23 kDa). V centrální dutině každého z VP1 pentamerů je inkorporován jeden z těchto minoritních proteinů (Obrázek 1B). (Griffith *et al.*, 1992; Chen *et al.*, 1998; Liddington *et al.*, 1991)



**Obrázek 1: Struktura virionu MPyV**

**A:** Kapsida myšího polyomaviru vykazuje ikosahedrální symetrii. Její povrch tvoří 72 pentamerů virového proteinu VP1. Upraveno podle (Jean-Yves Sgro, zdroj: <http://www.virology.wisc.edu/virusworld/viruslist.php?virus=pol>, staženo 21. 12. 2016), obrázek byl vytvořen na základě struktury 1SID z databáze PDB (Stehle & Harrison, 1996). **B:** S každým VP1 pentamerem je asociován virový protein VP2 nebo VP3. Na obrázku je schematicky znázorněna interakce proteinu VP1 a VP2 na průřezu VP1 pentamerem. Převzato z (Chen *et al.*, 1998).

### 2.1.3 Viru podobné částice

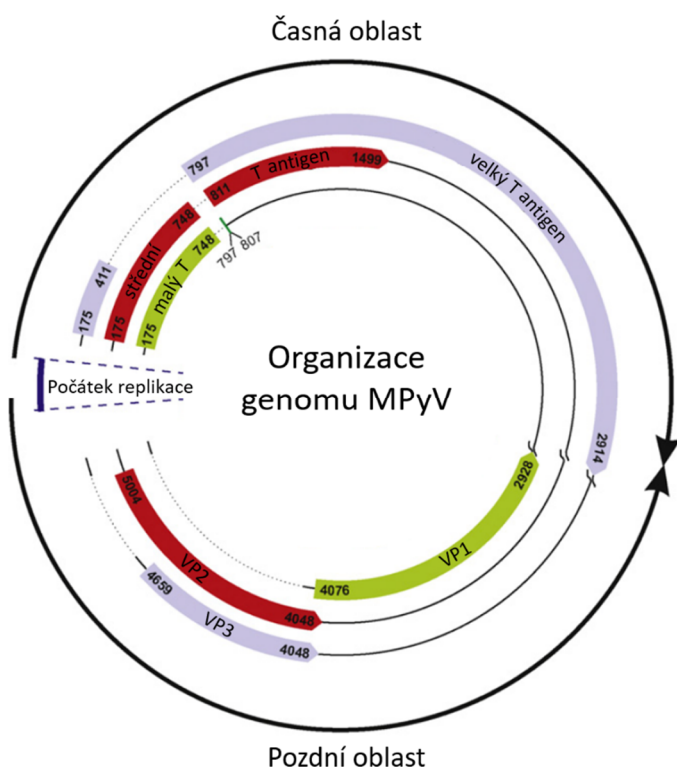
V buňkách infikovaných MPyV dochází během replikace viru ve velké míře také k produkci neinfekčních virových částic. Tyto částice vznikají díky schopnosti strukturního proteinu VP1 samovolně se uspořádat do struktur prázdných kapsid.

Viru podobné částice mohou být izolovány po expresi virových strukturních proteinů v eukaryotických buňkách nebo složeny z virových proteinů produkovaných v bakteriálních buňkách (Shrnut v Teunissen *et al.*, 2013). VLPs mohou obsahovat všechny tři virové strukturní proteiny nebo pouze strukturní protein VP1 (Salunke *et al.*, 1986). Viru podobné částice mohou být prázdné nebo obsahovat části DNA hostitelských buněk (Gillock *et al.*, 1997; Michel *et al.*, 1967).

Strukturní proteiny MPyV mohou vytvářet také další typy částic, které se od virionů odlišují velikostí nebo tvarem. Vznikají tak například různorodé tubulární útvary. Tyto částice jsou rovněž tvořeny primárně pentamery proteinu VP1. (Baker *et al.*, 1983; Salunke *et al.*, 1989) Výsledný tvar, do kterého se pentamery složí, závisí na vlastnostech prostředí, ve kterém se proteiny nachází – na obsahu a koncentraci iontů v roztoku, přítomnosti vápenatých iontů nebo pH roztoku (Salunke *et al.*, 1989).

### 2.1.4 Organizace genomu MPyV

Genom myšího polyomaviru je tvořen kruhovou dsDNA o velikosti přibližně 5,3 kb (Obrázek 2). Je rozdělen na časnou, pozdní a regulační oblast. Transkripce probíhá obousměrně z iniciačních míst, která se nachází v regulační oblasti genomu. Časné geny kódují nestrukturní proteiny, virové T antigeny: velký T antigen (LT), střední T antigen (MT) a malý T antigen (ST). K jejich expresi dochází do dopravení virového genomu do jádra buňky. Pozdní geny kódují strukturní proteiny a jsou exprimovány po replikaci virového genomu. Genom je replikován z jediného replikačního počátku, který se nachází rovněž v regulační oblasti. (Shrnuto v Knipe & Howley, 2007) V regulační oblasti genomu se dále nacházejí virové enhancery. V této oblasti genomu se nachází řada vazebných míst pro proteiny, které regulují aktivaci virové replikace a transkripce (Mueller *et al.*, 1988; Tyndall *et al.*, 1981; Veldman *et al.*, 1985). Pro aktivaci virové replikace a transkripce jsou důležitá zejména vazebná místa pro protein AP-1 (pro myší homolog se někdy používá i označení PEA1) a pro protein PEA3 (Martin *et al.*, 1988; Yoo *et al.*, 1991).



**Obrázek 2: Genom myšího polyomaviru**

Genom MPyV tvoří kruhová dsDNA. Transkripce časné a pozdní oblasti genomu (vyznačeno šipkami) probíhá obousměrně z opačných vláken DNA. Virus kóduje šest proteinů (vyznačeno barevně). Replikační počátek se nachází v regulační oblasti. Upraveno podle přehledného článku (Atkin *et al.*, 2009).

## 2.1.5 Replikační cyklus MPyV

### 2.1.5.1 Vstup viru do buňky a transport do jádra

MPyV vstupuje do buňky receptorem zprostředkovanou endocytózou. Dosud byly popsány čtyři gangliosidy, které mohou sloužit jako receptor pro MPyV: GD1a, GT1b (Tsai *et al.*, 2003), GT1a (Buch *et al.*, 2015; You *et al.*, 2015) a GD1b (You *et al.*, 2015). Vazba virionu na receptor je zajištěna virovým proteinem VP1, který se váže na kyselinu sialovou na povrchu gangliosidu (Stehle & Harrison, 1996; Tsai *et al.*, 2003). Bylo popsáno, že strukturní protein VP1 váže kyselinu sialovou i na dalších povrchových molekulách. Tyto interakce nevedou k produktivní virové infekci, ale mohou ovlivnit buněčnou signalizaci nebo aktivovat nespecifickou imunitní odpověď. (You *et al.*, 2015)

Po navázání na receptor dochází k endocytóze virionu do buňky. Endocytóza MPyV probíhá v oblasti membránových raftů (Gilbert & Benjamin, 2004; Richterová *et al.*, 2001) a je pro ni nezbytná destabilizace aktinové sítě pod plazmatickou membránou (Gilbert *et al.*, 2003; Richterová *et al.*, 2001). Internalizace virové částice je zajištěna hladkými mikropinocytickými váčky (Gilbert & Benjamin, 2000; Griffith & Consigli, 1984; Richterová *et al.*, 2001), které posléze splývají s časnými endozomy (Liebl *et al.*, 2006). Následně lze virus detekovat i v pozdních (Qian *et al.*, 2009) a recyklujících endozomech (Liebl *et al.*, 2006; Mannová & Forstová, 2003). K replikaci jsou ovšem virové částice směřovány pouze z časných a pozdních endozomů, zatímco viriony z recyklujících endozomů nepokračují v infekční cestě (Žíla *et al.*, 2014).

Bylo popsáno, že kyselé pH v endozomech je nezbytné pro produktivní infekci (Liebl *et al.*, 2006; Qian *et al.*, 2009). Qian a kolektiv (2009) zjistili, že v kyselém pH dochází ke konformačním změnám proteinu VP1 a navrhli hypotézu, že tyto změny umožňují pozdější rozvolnění virové kapsidy.

Z endozomů jsou viriony dopraveny do lumen endoplazmatického retikula (ER) (Mannová & Forstová, 2003), přičemž pro tento transport MPyV využívá buněčné mikrotubuly (Gilbert & Benjamin, 2004; Gilbert *et al.*, 2003; Žíla *et al.*, 2014) a doprava je závislá na molekulárním motoru dyneinu (Žíla *et al.*, 2014).

V ER dochází k částečnému rozvolnění virové kapsidy pomocí buněčných enzymů (Gilbert *et al.*, 2006; Magnuson *et al.*, 2005; Walczak & Tsai, 2011) a virový genom (asociovaný s virovými proteiny) je transportován do jádra buňky. Tento krok virové infekce dosud není zcela prostudován, ale dosavadní poznatky nasvědčují tomu, že vstupu do jádra předchází transport z ER do cytosolu (Huérfino *et al.*, 2017; Lilley *et al.*, 2006).

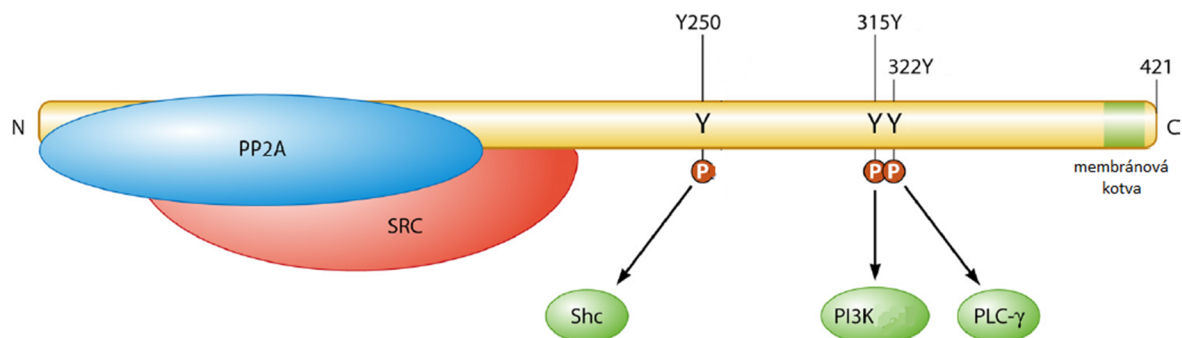
### 2.1.5.2 Časná transkripce MPyV

Po vstupu do jádra dochází k transkripci časně oblasti virového genomu hostitelskou DNA dependentní RNA polymerázou II (Beard *et al.*, 1975). Alternativním sestřihem transkriptu časně oblasti vznikají mRNA pro virové T antigeny (Shrnuto v Huang & Carmichael, 2009). Pro replikaci virového genomu je nezbytná exprese virového antigenu LT. I zbývající T antigeny se ale podílí na regulaci virové replikace a transkripce (Cowie & Kamen, 1984; Chen *et al.*, 2006).

Virové T antigeny interagují s řadou hostitelských faktorů, které se uplatňují v buněčné signalizaci a regulaci replikačního cyklu buňky. Protože replikace MPyV je závislá na replikačním aparátu infikované buňky, hraje schopnost ovlivňovat buněčný cyklus v infekci MPyV významnou roli.

Velký T antigen podporuje několika mechanismy vstup buňky do S fáze. Patří mezi ně vazba buněčného proteinu pRb (Freund *et al.*, 1994) nebo transaktivace genů kódujících proteiny, které stimulují průběh buněčného cyklu (Nemethova *et al.*, 2004). Průběh buněčného cyklu podporuje i ST, a to vazbou na fosfatázu PP2A (Mullane *et al.*, 1998; Pallas *et al.*, 1990).

Hlavní roli v transformaci hostitelské buňky ovšem hraje střední T antigen. MT se v buňce nachází asociovaný s buněčnými membránami (Carmichael *et al.*, 1982; Ito *et al.*, 1977). Na cytoplazmatické membráně MT váže fosfatázu PP2A (Pallas *et al.*, 1990). Interakce s PP2A umožňuje MT vázat kinázu c-Src (Courtneidge & Smith, 1983; Ogris *et al.*, 1999), která je následně aktivována (Courtneidge, 1985). Jako substrát c-Src slouží i samotný MT, přičemž fosforylace MT umožňuje jeho interakci s dalšími molekulami podílejícími se na buněčné signalizaci (Obrázek 3). Jejich prostřednictvím pak MT dále ovlivňuje průběh buněčného cyklu.



**Obrázek 3: Střední T antigen je hlavní transformující protein MPyV**

Na obrázku jsou schematicky znázorněny interakce proteinu MT s vybranými buněčnými proteiny. Zelený obdélník znázorňuje hydrofobní kotvu proteinu. Vazba fosfatázy PP2A umožňuje MT vázat a aktivovat kinázu c-Src (SRC). Ta fosforyluje na několika místech i MT a tyto fosforylace umožňují interakce MT s dalšími proteiny podílejícími se na regulaci buněčného cyklu. Fosforylace tyrosinu 250 umožňuje vazbu adaptorové molekuly Shc. Následná fosforylace proteinu Shc kinázou c-Src vede k interakci s proteinem Grb2 a posléze aktivaci GTPázy Ras (Dilworth *et al.*, 1994). Dalším fosforylovaným tyrosinem je Y315. Tato posttranslační modifikace vede k vazbě fosfatidylinositol kinázy (PI3K) a poté aktivaci kinázy Akt (Kaplan *et al.*, 1986; Meili *et al.*, 1998). Fosforylace tyrosinu 322 potom umožňuje MT vázat a aktivovat fosfolipázu C-γ (PLC-γ) (Su *et al.*, 1995).

Upraveno podle přehledného článku (Fluck & Schaffhausen, 2009).

### 2.1.5.3 Morfogeneze virionů

Po zahájení replikace virové DNA nastává i transkripce pozdní oblasti virového genomu. V pozdní fázi transkripce nejprve vznikají dlouhé molekuly RNA, které svou délkou několikrát přesahují velikost virového genomu. Z tohoto transkriptu poté sestřihem vznikají mRNA kódující jednotlivé strukturní proteiny MPyV. (Acheson *et al.*, 1971)

Po translaci proteinu VP1 se v cytoplazmě formují VP1 pentamery a dochází k jejich asociaci s minoritními kapsidovými proteiny. Tyto proteinové komplexy jsou transportovány do jádra hostitelské buňky, kde za účasti buněčných chaperonů dochází k morfogenezi virionů. (Barouch & Harrison, 1994; Bird *et al.*, 2008; Chromy *et al.*, 2003) Replikační cyklus viru je dokončen po 36 – 48 hodinách a šíření viru je provázáno nekrotou i apoptózou hostitelských buněk (An *et al.*, 2000; Huerfano *et al.*, 2010).

## 2.2 Toll-like receptory

### 2.2.1 Receptory nespecifického imunitního systému

V obraně proti virové infekci hraje klíčovou roli přirozená imunita. Umožňuje rychlé rozpoznání probíhající infekce a zprostředkovává protivirovou obranu a aktivaci složek adaptivní imunitní odpovědi. Aktivaci nespecifické imunity umožňují různé typy receptorů označovaných jako *pattern recognition receptors* (PRRs). Tyto receptory rozpoznávají struktury typické pro různé patogeny (takzvané *pathogen-associated molecular patterns*), ale jejich ligandy mohou být i buněčné molekuly asociované s poškozením tkáně. PRRs jsou spojeny se signalizačními drahami, které umožní přenést signál do jádra buňky a následnou syntézu efektorových molekul. Mezi PRRs patří i Toll-like receptory. (Shrnuto v Thompson *et al.*, 2011)

### 2.2.2 Struktura a funkce TLRs

TLRs jsou transmembránové receptory, které v buňce vážou ligandy na plazmatické membráně nebo v endozomálních kompartmentech. Zatímco TLRs lokalizované na plazmatické membráně obvykle rozpoznávají lipidy nebo proteiny, endozomální TLRs detekují cizorodé nukleové kyseliny (NA). Lokalizace v endozomech umožňuje, aby tyto TLRs detekovaly virové nukleové kyseliny po rozvolnění virové kapsidy, a také brání autoimunitní reakci na hostitelské NA (Barton *et al.*, 2006).

Jak již bylo zmíněno, TLRs jsou transmembránové proteiny. Do extracelulárního prostoru zasahuje jejich doména, která slouží k rozpoznání a vazbě ligandu. Pro tuto doménu je typický výskyt repetitivní aminokyseliny leucinu. Cytosolická část TLRs je tvořena TIR doménou, která zajišťuje přenos signálu. TLRs fungují ve formě homodimerů případně heterodimerů. Pro přenos signálu po navázání ligandu na TLR je nezbytná dimerizace TIR domén. Následně dochází k interakci cytoplazmatické části Toll-like receptoru a adaptorové molekuly. Vazba adaptorové molekuly rozhoduje o tom, jaké signalizační dráhy budou aktivovány a různé TLRs využívají odlišné kombinace těchto molekul. Signalizace z TLRs vede k aktivaci MAP kinázových signalizačních drah nebo transkripčních faktorů jako jsou NFkB, AP-1 či IRF-7. Po jejich aktivaci dochází k zvýšení exprese genů kódujících prozánětlivé cytokiny, interferony typu I, chemokiny nebo antimikrobiální peptidy. (Shrnuto v Akira & Takeda, 2004; a v Kawai & Akira, 2010)

Vznikající efekторы se podílí na obraně proti přítomným patogenům a modulují okolní prostředí. Jedním z důležitých efektů aktivace TLRs je navození zánětu. Mezi prozánětlivé cytokiny patří například TNFα, interleukin(IL)-6 nebo IL-12. Tyto cytokiny slouží jako signalizační



molekuly. Aktivují okolní buňky a stimulují tvorbu chemokinů nebo adhezivních molekul. Dále se podílejí například na modifikaci permeability endoteliální bariéry a rekrutování imunitních buněk do místa zánětu. (Shrnuto v Takeuchi & Akira, 2010)

Další významnou skupinou efektorových molekul, k jejichž syntéze dochází po aktivaci TLRs, jsou interferony typu I, které hrají významnou roli v protivirové odpovědi (zejména pak interferony  $\alpha$  a  $\beta$ ). Interferony aktivují další signalizační dráhy a ovlivňují expresi specifických genů. Takto vyvolaná odpověď vede k eliminaci složek virů, apoptóze infikovaných buněk, ale i k navození protivirového stavu v dosud neinfikovaných buňkách. (Shrnuto v McNab *et al.*, 2015)

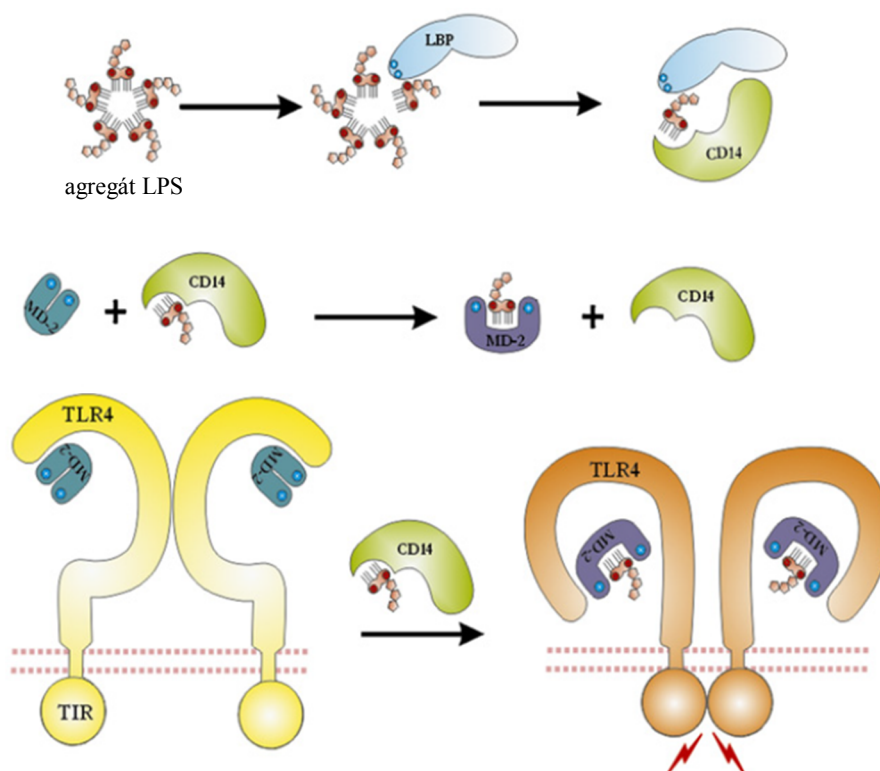
Významnou funkcí signalizace z TLRs je také aktivace adaptivní imunitní odpovědi (Reynolds *et al.*, 2010; Schnare *et al.*, 2001; Termeer *et al.*, 2002).

Během studia střevních epitelálních buněk a fibroblastů bylo zjištěno, že signalizace z TLRs může buňkám poskytnout také proliferační signál. Takto se mohou TLRs podílet na zachování homeostázy, případně na reparaci poškozené tkáně. (Hasan *et al.*, 2005, 2007; Rakoff-Nahoum *et al.*, 2004)

### 2.2.3 Toll-like receptor 4 (TLR4)

K vazbě ligandu a TLR4 dochází na plazmatické membráně. Hlavním ligandem TLR4 je lipopolysacharid (LPS) gram-negativních bakterií (Poltorak *et al.*, 1998). TLR4 rozpoznává i řadu dalších ligandů, které umožňují rozpoznání bakteriální či virové infekce a signalizaci mohou aktivovat i endogenní molekuly (Shnuto v Akira & Takeda, 2004). Nejvíce prostudovaná je aktivace TLR4 prostřednictvím LPS, a právě ze studia interakce LPS a TLR4 pramení značná část informací, které jsou o tomto receptoru známé.

Rozpoznání LPS a aktivace TLR4 vyžaduje součinnost hned několika proteinů. Prvním krokem aktivace je vytvoření komplexu LPS a LPS vazebného proteinu (LBP). LBP umožňuje vazbu LPS a proteinu CD14, který slouží jako koreceptor TLR4 (Lamping *et al.*, 1996; Wright *et al.*, 1990; Yu & Wright, 1996). CD14 zprostředkuje „navedení“ LPS na protein MD-2 nebo heterodimer MD-2 a TLR4. Tato role je nezbytná pro aktivaci signalizace při nízké koncentraci ligandu. (Muroi *et al.*, 2002; Prohinar *et al.*, 2007; da Silva Correia *et al.*, 2001) MD-2 neboli myeloidní diferenciací faktor 2 váže extracelulární doménu TLR4 a je zásadní pro fungování TLR4 (Shimazu *et al.*, 1999; Viriyakosol *et al.*, 2001). Pro úspěšnou aktivaci signalizace z TLR4 je dále nezbytná tvorba homodimeru ze dvou komplexů LPS, TLR4 a MD-2 (Kobayashi *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2009). Po dimerizaci receptoru nastává asociace intracelulárních TIR domén a dochází k vazbě adaptorové molekuly. (Obrázek 4)



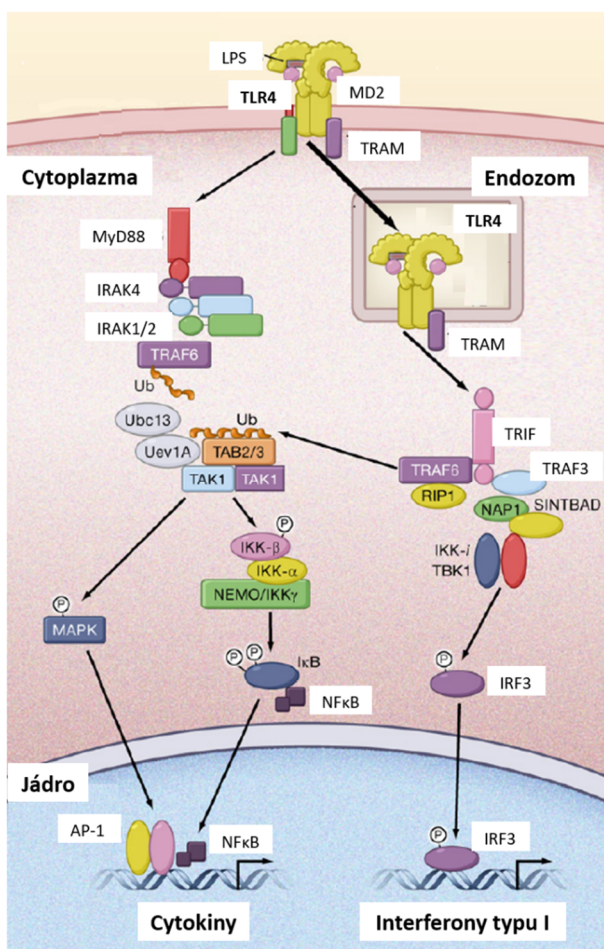
**Obrázek 4: Aktivace TLR4 prostřednictvím LPS**

Na obrázku je schematicky znázorněno rozpoznání LPS signalizačním komplexem TLR4. LPS vazebný protein (LBP) váže LPS. Následně dochází k přenosu LPS na MD-2 nebo dimer MD-2 a TLR4. Tento krok je zprostředkován CD14. Nezbytnost molekuly CD14 ovšem může být vykompenzována zvýšením koncentrace ligandu. Po vzniku dimeru ze dvou komplexů LPS, MD-2 a TLR4 dochází ke konformační změně, která je přenesena k cytoplazmatickým doménám a dochází k aktivaci receptoru. Upraveno podle přehledného článku (Jerala, 2007).

Kanonická dráha aktivace TLR4 pomocí LPS vede k tvorbě prozánětlivých cytokinů prostřednictvím MyD88 dependentní signalizační dráhy. Aktivace signalizace vyžaduje molekulu TIRAP, která zajišťuje navedení adaptorové molekuly MyD88 k plazmatické membráně (Kagan & Medzhitov, 2006). Signál dále přenáší serin/threoninové kinázy z rodiny IRAK a následně dochází k aktivaci molekuly TRAF6 (Kawagoe *et al.*, 2008; Muzio *et al.*, 1997; Wesche *et al.*, 1997) a kinázy TAK1. Toto vede k aktivaci transkripčních faktorů NFκB, IκBζ a MAP kináz (MAPK) (Adachi *et al.*, 1998; Sato *et al.*, 2005; Yamamoto *et al.*, 2004). Tyto transkripční faktory pak i s transkripčním faktorem AP-1 aktivovaným MAPK stimulují produkci prozánětlivých cytokinů.

V roce 1999 bylo popsáno, že ačkoliv vyřazení adaptoru MyD88 výrazně omezí odpověď myších makrofágů na LPS, stále dochází k aktivaci NFκB a MAPK. Tato odpověď ovšem nastávala v pozdějších časech po stimulaci buněk. (Kawai *et al.*, 1999) Tyto výsledky naznačily, že LPS může aktivovat i signalizační dráhu nezávislou na MyD88. Později bylo

zjištěno, že tato signální dráha závisí na adaptorových molekulách TRIF a TRAM a vede zejména k aktivaci transkripčního faktoru IRF3 a následné produkci interferonů typu I (Fitzgerald *et al.*, 2003; Kagan *et al.*, 2008; Kawai *et al.*, 2001; Yamamoto *et al.*, 2003a, b). Tento typ signalizace neprobíhá z plazmatické membrány, ale je aktivován po endocytóze signálního komplexu TLR4 a jeho internalizaci do endozomu (Kagan *et al.*, 2008; Tanimura *et al.*, 2008). Endocytóza TLR4 vyžaduje klatrin a dynamin (Husebye *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2012) a je regulována CD14 (Zanoni *et al.*, 2011). Po endocytóze komplex kolokalizuje se signální molekulou TRAF3, která zajišťuje přenos signálu (Tanimura *et al.*, 2008). (Obrázek 5)



**Obrázek 5: Signalizace z TLR4**

Schematické znázornění signalizace z TLR4. K vazbě ligandu a TLR4 dochází na plazmatické membráně. Po vazbě adaptorové molekuly MyD88 je aktivována signální dráha, která vede k aktivaci transkripčního faktoru NFκB a MAPK (a posléze transkripčního faktoru AP-1). Tyto transkripční faktory regulují syntézu prozánětlivých cytokinů. Po vazbě ligandu na TLR4 může dojít také k translokaci komplexu do endozomu. Zde dochází k interakci TIR domény TLR4 a adaptorové molekuly TRIF. Následně dochází k aktivaci transkripčního faktoru IRF3 a produkci interferonů typu I. Upraveno podle přehledného článku (Takeuchi & Akira, 2010)

### 2.2.3.1 Viry a TLR4

V roce 2000 bylo popsáno, že TLRs mohou sloužit také k rozpoznání virové infekce. Pomocí metody ELISA bylo zjištěno, že povrchový glykoprotein F respiračního syncytiálního viru (RSV) stimuluje u lidských mononukleárních buněk a myších makrofágů produkci prozánětlivých cytokinů. Použití makrofágů z myši, u které byl proveden genový knockout molekuly CD14, ukázalo, že odpověď je závislá na této molekule. Stejně tak byla produkce cytokinů utlumena v případě použití makrofágů TLR4 deficientní myši. Tyto výsledky

naznačily, že RSV může být buňkami rozpoznáván stejným způsobem jako LPS. (Kurt-Jones *et al.*, 2000) Následné *in vivo* studie sledující infekci RSV u TLR4 deficientních myší ukázaly, že rozpoznání viru prostřednictvím TLR4 je důležité pro aktivaci účinné imunitní odpovědi na infekci (Haynes *et al.*, 2001). Tyto závěry podpořily i výsledky studií, které sledovaly, jak polymorfismy v genu pro TLR4 ovlivní patogenezi RSV infekce u dětí (Awomoyi *et al.*, 2007; Tal *et al.*, 2004; Tulic *et al.*, 2007).

Byl popsán mechanismus, kterým se RSV může proti této aktivaci imunitní odpovědi bránit. Bylo zjištěno, že v mononukleárních buňkách dětí infikovaných RSV dochází k zvýšené expresi hostitelské miRNA miR-26b, a že zvýšená hladina této miRNA vede k omezení exprese genu pro TLR4 (Bakre *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2015).

Dalším příkladem viru rozpoznávaného prostřednictvím TLR4 je retrovirus infikující myši MMTV (mouse mammary tumor virus). MMTV se řadí mezi retroviry, které nedokážou překonat jadernou membránu a svůj replikační cyklus proto mohou dokončit pouze v replikujících se buňkách. Protože MMTV infikuje nezralé dendritické buňky a klidové B buňky v Peyerových plátech (Vacheron *et al.*, 2002), si vědci kladli otázku, jaký faktor vede k aktivaci těchto buněk a umožňuje první kolo infekce.

Při studiu infekce myší s defekty v TLR4 virem MMTV bylo zjištěno, že aktivace B buněk je zprostředkována vazbou viru na TLR4 (Rassa *et al.*, 2002). Další studium potom ukázalo, že v případě dendritických buněk interakce viru a TLR4 stimuluje maturaci buněk a vede k zvýšení množství virového receptoru CD71 na povrchu buněk (Burzyn *et al.*, 2004).

Klíčová role signalizace z TLR4 nespočívá pouze v aktivaci cílových buněk, ale i v zajištění specifického cytokinového prostředí. V B buňkách dochází k tvorbě IL-1, který aktivuje virovou transkripci (Rassa *et al.*, 2002), a také k produkci IL-10, který inhibuje cytotoxickou imunitní odpověď. Produkce IL-10 není stimulována přímo interakcí MMTV a B buněk, ale vazbou MMTV na TLR4 dendritických buněk a makrofágů, které posléze stimulují produkci tohoto cytokinu B buňkami (prostřednictvím produkce cytokinu IL-6 do okolního prostředí). (Jude *et al.*, 2003; Kane *et al.*, 2011)

Protože Rassa a kolektiv (2002) ukázali koimunoprecipitaci TLR4 a virového proteinu env, bylo předpokládáno, že ligandem aktivujícím signalizaci z TLR4 je právě env. Posléze ale bylo zjištěno, že virus do svého obalu inkorporuje proteiny, které mu umožní vyvázat bakteriální LPS z okolního prostředí. Lipopolysacharidy asociované s virionem poté interagují s TLR4 na povrchu buněk. (Kane *et al.*, 2011; Wilks *et al.*, 2015)

V případě MMTV tak má interakce s TLR4 opačný důsledek než v případě RSV: Vazba na TLR4 pro MMTV důležitým a nezbytným krokem replikačního cyklu.

Interakce virů s TLR4 může mít také imunopatologické důsledky. Onemocnění virem ebola může u pacientů vyvolat tzv. cytokinovou bouři a patologickou zánětlivou reakci. Bylo zjištěno, že virové částice mohou aktivovat syntézu prozánětlivých cytokinů právě interakcí s TLR4 (Okumura *et al.*, 2010). Toto zjištění přivedlo vědce k úvahám, zda by v budoucnu bylo možné využít v léčbě eboly inhibitory signalizace z TLR4 (Denner, 2015).

#### **2.2.3.2 MPyV a TLR4**

U novorozenech myši může vést infekce MPyV k rozvoji nádorů. O patogenitě MPyV rozhoduje několik faktorů, mezi které patří charakteristiky daného kmene MPyV i infikovaného kmene myši. Kritickou roli hrají zejména vlastnosti imunitního systému myši. (Shrnuto v Benjamin, 2001) Bylo popsáno, že náchylnost myši k nádorům indukovaným MPyV do značné míry závisí i na cytokinové odpovědi na MPyV. Makrofágy rezistentních kmenů myši odpovídají na infekci MPyV produkcí IL-12, který se podílí na polarizaci imunitní odpovědi a aktivaci cytotoxických T lymfocytů. Tato imunitní odpověď posléze může zamezit vzniku nádorů. (Velupillai *et al.*, 2002, 2006, 2012)

Mapování genomů myši, které se lišily v odpovědi na MPyV, poukázalo na možné zapojení TLR4 v odpovědi. Studium makrofágů s genovým knockoutem TLR4 pak bylo prokázáno, že cytokinová odpověď na MPyV skutečně závisí na TLR4. Transdukce cDNA pro TLR4 do těchto buněk vedla k obnově odpovědi. Genový knockout molekuly MyD88 potom umožnil potvrdit, že cytokinová odpověď makrofágů na MPyV je zprostředkována právě adaptorem MyD88 (Velupillai *et al.*, 2012).

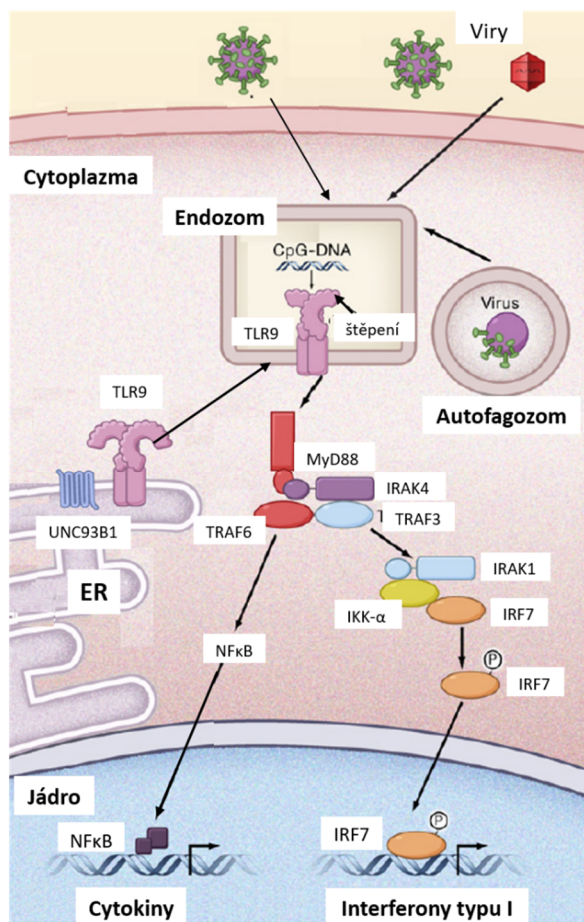
#### **2.2.4 Toll-like receptor 9 (TLR9)**

TLR9 je endozomální Toll-like receptor (Ahmad-Nejad *et al.*, 2002), který rozpoznává sekvence obsahující nemethylované CpG DNA dinukleotidy (CpG DNA) – typ sekvence charakteristický pro bakterie a některé viry (Bauer *et al.*, 2001; Hemmi *et al.*, 2000).

Toll-like receptory 9 jsou exprimovány především v imunitních buňkách. Signalizace z těchto receptorů aktivuje imunitní odpověď v B buňkách, makrofázích a zejména v plasmacytoidních dendritických buňkách (pDC), které jsou významnými producenty interferonů typu I (Hemmi *et al.*, 2000; Hornung *et al.*, 2002; Krug *et al.*, 2001). Studium expresního profilu různých typů lidských buněk ukázalo, že kromě krevních buněk dochází k expresi TLR9 v celé škále buněčných typů. V řadě případů ale byla mRNA kódující TLR9 zjištěna pouze v malém

množství. Oproti tomu buňky myších embryonálních fibroblastů ve stejné studii vykazaly vysokou hladinu mRNA pro TLR9 a aktivace TLR9 pomocí CpG DNA u nich vedla k produkci několika typů cytokinů. (Kurt-Jones *et al.*, 2004)

TLR9 v buňce reziduje v ER, odkud je stimulaci buněk CpG DNA transportován membránovým proteinem UNC93B1 do endozomu (Brinkmann *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2008; Latz *et al.*, 2004; Tabeta *et al.*, 2006). V endolysosomech dochází k proteolytickému štěpení TLR9, které dává vzniknout funkčnímu receptoru, který je schopen signalizovat po rozpoznání ligandu (Ewald *et al.*, 2008; Matsumoto *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2008; Sepulveda *et al.*, 2009). Signalizace z TLR9 je zprostředkována adaptorovou molekulou MyD88 a kinázou IRAK4. Signál je přenášen molekulou TRAF6 (Gohda *et al.*, 2004) a vede k aktivaci MAP kináz a NFκB (Hemmi *et al.*, 2000). Kromě prozánětlivých cytokinů vede aktivace TLR9 také k produkci interferonů typu I. Tato odpověď je rovněž řízena adaptorovou molekulou MyD88. Následně je aktivován transkripční faktor IRF7, který kontroluje produkci interferonů (Honda *et al.*, 2005; Kawai *et al.*, 2004). (Obrázek 6)



**Obrázek 6: Signalizace z TLR9**

Schematické znázornění signalizace z TLR9. TLR9 se v buňce nachází v ER, ze kterého je transportován proteinem UNC93B1 do endozomu. Zde dochází k jeho proteolytickému štěpení, které umožňuje rozpoznání ligandu a aktivaci signalizace. Ligandem TLR9 jsou NA obsahující nemethylované CpG dinukleotidy. Tyto sekvenční motivy se ve zvýšené míře nacházejí v NA některých bakterií a virů. Signalizace z TLR9 je zprostředkována adaptorovou molekulou MyD88. Signalizace přes TRAF6 aktivuje NFκB a vede k syntéze prozánětlivých cytokinů. Fosforylace transkripčního faktoru IRF7 vede k produkci interferonů typu I. Upraveno podle přehledného článku (Takeuchi & Akira, 2010)



#### **2.2.4.1 Viry a TLR9**

Toll-like receptor 9 umožňuje rozpoznání infekce různými viry s DNA genomem, mezi které patří herpesviry (Fiola *et al.*, 2010; Lund *et al.*, 2003; Rasmussen *et al.*, 2007), adenoviry (Pahl *et al.*, 2012) nebo poxviry (von Buttlar *et al.*, 2014; Samuelsson *et al.*, 2008).

V imunitní odpovědi proti virové infekci hraje důležitou roli signalizace z TLR7 a TLR9 plasmacytoidních dendritických buněk, významných producentů interferonů typu I. Právě díky produkci interferonů stimulované z TLR9, se mohou pDC podílet na potlačení infekce například lidským virem HSV-2 (herpes simplex typu 2) (Lund *et al.*, 2003).

Tyto poznatky jsou přenášeny i do léčby virových onemocnění a jsou hledány způsoby, jak využít agonisty TLR9 k aktivaci účinné antivirové odpovědi například proti viru HIV (Martinson *et al.*, 2007).

### **2.3 Polyomaviry a MAPK**

#### **2.3.1 MAP kinázy**

MAP kinázové signalizační kaskády představují jedny z nejvýznamnějších signalizačních drah v buňce. Je to proto, že ovlivňují prakticky všechny zásadní kroky života buňky: regulují buněčný cyklus, vstup do apoptózy nebo buněčnou diferenciaci.

Signalizace je aktivována vazbou ligandu na receptor napojený na kaskádu. Ligandem mohou být například růstové faktory, hormony nebo cytokiny. Vlastní MAP kinázová signalizační kaskáda je potom tvořena hierarchicky seřazenými enzymy, které vedou až k aktivaci MAPK, mezi které patří kinázy ERK, JNK, p38 nebo ERK5. MAPK poté fosforyluje řadu různých proteinů a reguluje jejich aktivitu. (Shrnuto v Chang & Karin, 2001)

Navzdory základnímu hierarchickému uspořádání není signalizace ryze přímočará. Nejenže různé stimuly aktivují různé kinázy, ale i kombinace signálů může vést k odlišným výstupům než jednotlivé signály. Odpovědi se také mohou lišit v závislosti na buněčném typu nebo diferenciaci buňky. Specifita signalizace je zajištěna také řadou „scaffold“ proteinů, které kontrolují interakce zapojených kináz. (Shrnuto v Chang & Karin, 2001)

#### **2.3.2 Role MAPK v životním cyklu lidských polyomavirů**

Bylo popsáno, že infekce některými typy polyomavirů vede k aktivaci MAP kinázové signalizace. Zejména s využitím chemických inhibitorů konkrétních signalizačních drah, byl popsán význam této signalizace pro polyomavirové infekce.

Například v případě polyomaviru JC bylo zjištěno, že během prvních hodin po infekci lidských gliových buněk dochází k aktivaci kinázy ERK (Querbes *et al.*, 2004). Inhibice této kinázy v

buňkách PDA pomocí inhibitoru PD98059 nebo U0126 vedla k omezení replikace viru JC. Oproti tomu aktivace signalizace prostřednictvím cytokinu TGF $\beta$ 1 virovou replikaci stimulovala. (Ravichandran *et al.*, 2007)

U dalšího lidského polyomaviru – BK viru, nebylo zjištěno, že by virová infekce vedla k aktivaci MAP kináz. Nicméně bylo ukázáno, že i u tohoto viru stimulace ERK amplifikuje virovou replikaci a inhibice této signalizační dráhy pomocí inhibitoru U0126 replikaci omezuje. S využitím luciferázového reportérového systému bylo ukázáno, že aktivační efekt ERK nesouvisí s transkripční regulací nekódující oblasti genomu BK viru. Místo toho je tento efekt zprostředkován stimulací replikačního cyklu buňky. (Seamone *et al.*, 2010)

Mezi polyomaviry, jejichž replikace je ovlivněna inhibicí MAPK, se nedávno zařadil i polyomavirus karcinomu Merkelových buněk. Studium MCPyV je komplikováno skutečností, že dosud nepanuje shoda ohledně hostitelských buněk viru. V roce 2016 ovšem byla publikována práce, jejíž autoři ukázali, že je virus schopen se účinně replikovat v lidských dermálních fibroblastech. Tato infekce byla inhibována látkou trametinib – inhibitorem kinázy MEK (Liu *et al.*, 2016). Trametinib je úspěšně využíván v léčbě pacientů trpících melanomem (Frankel *et al.*, 2017; Marconcini *et al.*, 2017). Práce Liu a kolektivu (2016) tak může pomoci nejen studiu replikačního cyklu a mechanismu nádorové transformace MCPyV, ale i vývoji terapie pro pacienty s karcinomem Merkelových buněk.

### **2.3.3 MAPK a myší polyomavirus**

MAP kinázovou signalizaci v buňce aktivuje i MPyV. Bylo zjištěno, že po infekci buněk MEF MPyV (multiplicitou infekce (MOI) 50) dochází k aktivaci kinázy ERK a JNK. Autoři tohoto objevu popsali, že aktivace MAPK je zprostředkována interakcí proteinu VP1 s gangliosidy a integrinem  $\alpha$ 4 na povrchu buněk. (O'Hara & Garcea, 2016)

MAP kinázové signalizační dráhy mohou být ovlivněny i virovými T antigeny, zejména pak MT. Vazba MT a PP2A umožňuje aktivaci kinázy JNK (Mullane *et al.*, 1998) a aktivace fosfatidilinositol 3 kinázy (PI3K) zprostředkovává i fosforylaci ERK (Urich *et al.*, 1995). MAPK mohou být dále aktivovány jako důsledek MT zprostředkované aktivace GTPázy ras (Urich *et al.*, 1995).



### 3 Cíle práce

#### **Rozpoznání myšího polyomaviru Toll-like receptory**

Bylo zjištěno, že buňky myších makrofágů rozpoznávají MPyV prostřednictvím TLR4. Zajímalo nás, zda k obdobnému rozpoznání MPyV dochází i v hostitelských myších embryonálních fibroblastech a jak tato interakce ovlivní časnou fázi virové infekce. Protože během infekce viriony MPyV prochází endozomálním systémem hostitelské buňky, nás dále zajímalo, zda během infekce dochází k aktivaci některého z endozomálních TLRs. Genom MPyV je tvořen dsDNA, a proto jsme se při hledání možné interakce zaměřili na TLR9.

**Cílem této práce bylo určit, zda buňky MEF rozpoznávají MPyV prostřednictvím Toll-like receptorů a popsat, zda inhibice signalizace z TLR4 nebo TLR9 ovlivní infekci buněk MPyV.**

Dílčí cíle:

- Stanovit, zda buňky MEF rozeznávají MPyV prostřednictvím TLRs
- Porovnat odpověď buněk MEF na viriony MPyV a na VLPs
- Určit, zda použití inhibitoru a antagonistů TLR4 a TLR9 ovlivní časnou fázi infekce MPyV

#### **Myší polyomavirus a MAPK**

MAP kinázové signalizační dráhy hrají klíčovou roli v životě buňky. Podílejí se na regulaci genové exprese, průběhu replikačního cyklu buňky nebo její diferenciaci. Využití inhibitorů MAP kinázových signalizačních drah v minulosti umožnilo popsat význam MAPK v životním cyklu některých lidských polyomavirů.

**Dalším cílem této práce bylo popsat, zda inhibice vybraných MAP kináz pomocí chemických inhibitorů ovlivní infekci buněk MEF MPyV.**

- Stanovit, zda inhibitor kinázy p38 (SB203580, SB202190), MEK (PD0325901) nebo JNK (SP600125) ovlivní počet buněk MEF infikovaných MPyV

## 4 Materiál a metody

### 4.1 Materiály

#### 4.1.1 Seznam použitých chemikálií a enzymů (s uvedením výrobce)

|   |  |
|---|--|
| Akrylamid (Serva)                                       | Chlorid cesný (Serva)                    |
| Agaróza I (Amresco)                                     | Chlorid draselný (Lachema)               |
| Aprotinin (Sigma)                                       | Chlorid sodný (Lach-Ner)                 |
| $\beta$ -merkптоethanol (Serva)                         | Chlorid vápenatý (Sigma)                 |
| bis-akrylamid (Serva)                                   | Kyselina chlorovodíková (Lach-Ner)       |
| Bovinní sérový albumin - BSA (Sigma)                    | Kyselina fosforečná (Lachema)            |
| Bromfenolová modř (Lachema)                             | Kyselina fosfowolframová (Fluka)         |
| CLI-095 (Invovogen)                                     | Kyselina octová (Lach-Ner)               |
| COmplete Tablets, Mini EDTA-free (Roche)                | Kyselina p-kumarová (Sigma)              |
| Coomassie Brilliant Blue G 250 (Serva)                  | Kyselina sírová (Lachema)                |
| DAPI – 4,6-diamino-fenylindol dichlorid (Sigma-Aldrich) | Loading Buffer 10 x (Takara)             |
| Deoxycholát sodný (Fluka)                               | LPS-RS ultrapure (Invivogen)             |
| Dihydrogenfosforečnan draselný (Lachema)                | Luminol (Sigma)                          |
| Dimethylsulfoxid – DMSO (Sigma)                         | Methanol (Penta)                         |
| dNTP PCR mix (deoxynukleotidy) (Serva)                  | LPS z <i>E-coli</i> (Sigma)              |
| Dodecylsírán sodný – SDS (Sigma-Aldrich)                | Neuraminidáza (Sigma)                    |
| Dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného (Lach-Ner)    | NP-40 (Sigma)                            |
| Ethanol (Lach-Ner)                                      | ODN 1668 (Invivogen)                     |
| Ethylendiamintetraacetát disodný – EDTA (Serva)         | ODN 2088 (Invivogen)                     |
| GelCode™ Blue Stain Reagent (Thermo Fisher Scientific)  | Parafinový olej (Bayol F) (Serva)        |
| GelRed™ (Biotium)                                       | Paraformaldehyd (Sigma)                  |
| Glycin (Serva)  | PD0325901(inhibitor MEK, Invivogen)      |
| Glycerol (Lach-Ner)                                     | Peroxid vodíku (30%) (Sigma)             |
|   | Persíran amonný (Serva)                  |
|   | Pufr pro Vent polymerázu (10x) (BioLabs) |
|   | Sacharóza (Lach-Ner)                     |
|   | SB202190 (inhibitor p38, Invivogen)      |
|   | SB203580 (inhibitor p38, Invivogen)      |
|   | SP600125 (inhibitor JNK, Invivogen)      |
|   | Sušené mléko (Laktino)                   |

|   |                           |
|---|---------------------------|
| Tetramethylethyldiamin – TEMED (Serva)        | Tween-20 (Fluka)          |
| Tris(hydroxymethyl)aminomethan – Tris (Serva) | Ustalořač (Foma)          |
| Triton X-100 (Roth)                           | Vent polymeráza (BioLabs) |
| Trypsin (Gibco)                               | Versen (Baria)            |
|   | Vývojka (Foma)            |

#### 4.1.2 Buněčné linie

**3T6:** stabilní linie myších fibroblastů (DSMZ, ACC 202)

**MEF:** primární buněčná linie myších embryonálních fibroblastů (Lonza, M-FB-481)

**Sf9:** buněčná linie odvozená od *Spodoptera frugiperda* (ATCC, CRL-1711)

#### 4.1.3 Viry

**Myší polyomavirus, kmen BG**

**Rekombinantní bakulovirus VL-VP1:** Bakulovirus kódující protein VP1 myšího polyomaviru (Forstová *et al.*, 1993).

#### 4.1.4 Vektory

**pwP:** Vektor pro expresi proteinu VP1 myšího polyomaviru v savčích buňkách (Pastrana *et al.*, 2009, Addgene plazmid 22519).

**ph3p:** Vektor pro expresi proteinu VP3 myšího polyomaviru v savčích buňkách (Pastrana *et al.*, 2009, Addgene plazmid 22521).

#### 4.1.5 Média pro tkáňové kultury

**Médium DMEM s 10% sérem:** DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium – high glucose; Sigma), 10% fetální bovinní sérum (v/v) (Gibco)

**Médium DMEM s 0,5% sérem:** DMEM (Sigma), 10% fetální bovinní sérum (v/v) (Gibco), směs antibiotik pro tkáňové kultury (Používaný 100x koncentrovaný roztok obsahuje na 1ml: 10 000 jednotek penicilinu, 10 mg streptomycinu, 20 mg amphotericinu B; Sigma)

**Médium DMEM bez séra:** DMEM (Sigma)

**Médium RPMI-1640** (Sigma)

**Médium TNM-FH s 10% sérem:** TNM-FH (Sigma), 10% fetální bovinní sérum (v/v) (Gibco), směs antibiotik pro tkáňové kultury (Používaný 100x koncentrovaný roztok obsahuje na 1ml: 10 000 jednotek penicilinu, 10 mg streptomycinu, 20 mg amphotericinu B; Sigma)

#### 4.1.6 Složení nejčastěji používaných roztoků

**PBS:** 0,14M NaCl, 2,7mM KCl, 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O, 17,6mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

**Pufr B:** 10mM Tris-HCl (pH=7,4), 150mM NaCl, 0,01mM CaCl<sub>2</sub>

**Trypsin:** 0,25% trypsin v PBS (v/v)

**Versen:** 0,25% versen v PBS (v/v)

***Poznámka:** Pokud není uvedeno jinak, byla při přípravě roztoků použitých v této práci použita jako rozpouštědlo destilovaná voda.*

#### 4.1.7 Primery

V této diplomové práci byly využity primery komplementární k mRNA pro zvolené proteiny. Jejich sekvence jsou uvedeny ve směru od 5' konce k 3' konci.

|       |                |                           |
|-------|----------------|---------------------------|
| IL-6  | Přímý primer:  | CGTGGAAATGAGAAAAGAGTTGTGC |
|       | Zpětný primer: | CAGGTAGCTATGGTACTCCAGAAG  |
| GAPDH | Přímý primer:  | ATGACATCAAGAAGGTGGTG      |
|       | Zpětný primer: | CATACCAGCAAATGAGCTTG      |
| HGPRT | Přímý primer:  | AGGACCTCTCGAAGTGTTGG      |
|       | Zpětný primer: | TTGCAGATTCAACTTGCGCT      |

Primery proti cDNA GAPDH (glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáze) a HGPRT (hypoxantin-guanin fosforibosyltransferáze) byly získány od S. Huérfano. Výrobce primerů: Integrated DNA Technologies

#### 4.1.8 Standardy molekulových hmotností

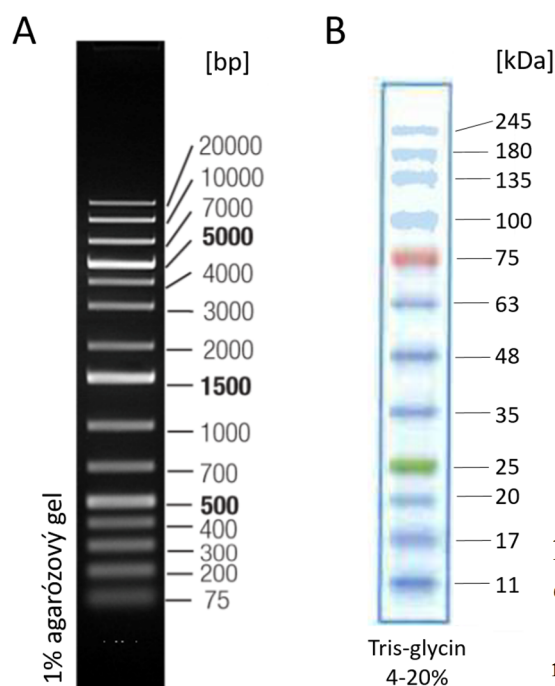
**Standard molekulové hmotnosti pro DNA elektroforézu:** GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, Obrázek 7A)

##### **Standard pro SDS-PAGE:**

Prestained Molecular Weight Marker (M.W. 26 600 – 180 000 D) (Sigma), ve standardu jsou použity tyto proteiny:

- α2-makroglobulin z koňského séra (180 kDa)
- β-galaktosidáza z *E-coli* (116 kDa)
- laktoferin z lidského mléka (90 kDa)
- pyruátkináza z králíčího svalstva (58 kDa)
- fumaráza z prasečího srdce (48 kDa)
- laktátdehydrogenáza z králíčího svalstva (36,5 kDa)
- triózafosfátizomeráza z králíčího svalstva (26,6 kDa)

## Black Protein Ladder (Biosystems, Obrázek 7B)



**Obrázek 7: Používané standardy molekulových hmotností**

**A:** Používaný standard molekulové hmotnosti pro DNA elektroforézu. Upraveno podle thermofisher.com (<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/SM1331>, staženo 1. 9. 2016) **B:** Standard molekulové hmotnosti Black Protein Ladder pro proteinovou elektroforézu. Upraveno podle cebiosys.cz (<http://www.cebiosys.cz/products/black-proteinladder-ready-to-use/>, staženo 10. 3. 2017)

### 4.1.9 Protilátky

#### 4.1.9.1 Primární protilátky

**MaVP1:** Myší monoklonální protilátka proti VP1 proteinu myšího polyomaviru (Forstová *et al.*, 1993), ředěna 10x.

**MaVP1-A5:** Myší monoklonální protilátka proti VP1 proteinu myšího polyomaviru (Morávková, 2001), ředěna 10x.

**MaVP2/3-1A2:** Myší monoklonální protilátka proti společné části proteinů VP2 a VP3 myšího polyomaviru (Forstová *et al.*, 1993), neředěna.

**RatLT1:** Krysí monoklonální protilátka proti LT antigenu myšího polyomaviru (Dilworth & Griffin, 1982), ředěna 100x.

#### 4.1.9.2 Sekundární protilátky

**GaM-Cy3:** Kozí protilátka proti myším imunoglobulinům konjugovaná s fluorescenční barvou Cy®3 (Thermo Fisher Scientific), ředěna 1 000x.

**GaM-HRP:** Kozí protilátka proti myším imunoglobulinům konjugovaná s křenovou peroxidázou (Biorad), ředěna 1 000x.

**GaR-Ax488:** Kozí protilátka proti krysím imunoglobulinům konjugovaná s fluorescenční barvou Alexa Fluor® 488 (Thermo Fisher Scientific), ředěna 1 000x.

#### **4.1.10 Komerční soupravy**

**Cell Line Nucleofector<sup>R</sup> Kit V** (Lonza): Transfekce savčích buněk metodou nukleofekce.

**High Pure RNA Isolation Kit** (Roche): Izolace RNA z buněk.

**iScript<sup>TM</sup> cDNA Synthesis Kit** (Biorad): Přepis RNA do cDNA reverzní transkripcí.

**LightCycler<sup>®</sup> 480 SYBR Green I Master** (Roche): Kvantitativní PCR reakce.

**Mouse IL-6 ELISA development kit** (Mabtech): Stanovení produkce cytokinu IL-6 buňkami myších fibroblastů.

**TMB substrate reagent set** (BD): Vizualizace signálu při metodě ELISA.

#### **4.1.11 Použitý software**

**AnalySIS<sup>B</sup>** (Olympus): Ovládací software kamery fluorescenčního mikroskopu IX71, verze 5.0

**Amersham Imager 600 Software** (GE Healthcare): Ovládací software pro přístroj Amersham Imager 600, verze 1.1.1

**GraphPad Prism** (GraphPad Software): Software použitý pro výpočet statistických analýz, verze 7.03

**GeneSys** (Syngene): Ovládací software kamery k focení gelů v UV transiluminátoru, verze 1.5.4.0

**i-control<sup>TM</sup>** (Tecan): Ovládací software přístroje ELISA reader Infinite<sup>®</sup> 200PRO, verze 1.10.4.0

**ImageJ** (NIH): Práce s obrázky, verze 1.50i

**iTEM** (Olympus): Ovládací software kamery elektronového mikroskopu JEOL JEM 1200EX, verze 5.1

**LightCycler<sup>®</sup> 480 Software** (Roche): Software použitý pro analýzu výsledků kvantitativní PCR, verze 1.5.1.42

**NanoDrop 2000/2000c** (Thermo Scientific): Ovládací software k přístroji Nanodrop 2000

## **4.2 Metody**

### **4.2.1 Práce s tkáňovými kulturami**

#### **4.2.1.1 Kultivace myších buněk 3T6 a MEF**

Buňky 3T6 a MEF byly kultivovány v inkubátoru (Schoeller) při 37 °C a 5% atmosféře CO<sub>2</sub>. Kultivace buněk probíhala v médiu DMEM s 10% sérem. Misky (TPP / JET biofil) s buňkami byly průběžně kontrolovány pod světelným mikroskopem Olympus CK40 (Olympus).

#### **4.2.1.2 Kultivace hmyzích buněk Sf9**

Buňky Sf9 byly kultivovány v inkubátoru (VWR) při 27 °C v médiu TNM-FH s 10% sérem.

#### **4.2.1.3 Pasážování myších buněk 3T6 a MEF**

Z misky s konfluentně narostlými buňkami bylo odsáto médium a buňky byly opláchnuty roztokem versenu. Poté byl na misku s buňkami přidán roztok trypsinu (0,5 ml na misku o průměru 6 cm nebo 1 ml na misku o průměru 10 cm) a misky byly umístěny v inkubátoru při 37 °C přibližně 5 minut. Poté bylo do misky doplněno médium DMEM s 10% sérem a médium s buňkami bylo rozděleno na nové misky ve zvoleném poměru. Dále bylo na misky doplněno médium do celkového objemu 5 ml pro misky o průměru 6 cm nebo 10 ml pro misky o průměru 10 cm. Buňky 3T6 byly pasážovány dvakrát týdně v poměru 1:10. Buňky MEF byly pasážovány jednou týdně v poměru 1:4.

V případech, kdy bylo pro experimenty potřeba pasážovat na misku nebo jamku ve vícejamkové desce konkrétní počet buněk, byly buňky po uvolnění z povrchu misky trypsinem a přidání média spočítány pomocí počítací komůrky (Assistent). Do nové kultivační nádoby bylo přidáno množství buněčné suspenze odpovídající požadovanému počtu buněk. Pak bylo k buňkám opět doplněno médium.

#### Použité roztoky a média

**Roztok versenu**

**Roztok trypsinu**

**Médium DMEM s 10% sérem**

#### **4.2.1.4 Pasážování hmyzích buněk Sf9**

Konfluentně narostlé buňky byly seškrabány z povrchu misky pryžovým škrabátkem. Buněčná suspenze pak byla naředěna médiem TNM-FH ve zvoleném poměru a rozdělena na nové misky. Buňky Sf9 byly pasážovány dvakrát týdně v poměru 1:4.

#### **4.2.1.5 Synchronizace buněk MEF**

Z buněk bylo odsáto médium a bylo k nim přidáno médium DMEM s 0,5% sérem. S tímto médiem byly buňky kultivovány přes noc před zahájením experimentů vyžadujících synchronizaci.

#### **4.2.1.6 Infekce (nesynchronizovaných) myších buněk MPyV**

Z buněk bylo odsáto médium a bylo k nim přidáno médium DMEM bez séra. Poté byly buňky na 15 minut vráceny do inkubátoru. Následně bylo z buněk znovu odsáto médium a bylo k nim přidáno virové inokulum ředěné v médiu DMEM bez séra. Následně byly buňky hodinu ponechány v inkubátoru při 37 °C. Čas infekce byl počítán od vložení do inkubátoru. Každých 15 minut se s miskami opatrně kývalo, aby bylo médium s MPyV rozprostřeno rovnoměrně po povrchu misky. Poté bylo k buňkám doplněno médium DMEM s 10% sérem. Používaný objem média bez séra s MPyV byl pro misky o průměru 10 cm 1 ml a pro jamky 24 jamkové desky 200 µl. Čas infekce byl počítán od přidání virového inokula na buňky.

##### Použitá média

**Médium DMEM s 10% sérem**

**Médium DMEM bez séra**

#### **4.2.1.7 Infekce synchronizovaných buněk MEF MPyV**

Z buněk bylo odsáto médium a bylo k nim přidáno virové inokulum ředěné v médiu DMEM s 0,5% sérem. Buňky byly hodinu ponechány při 37 °C, přičemž každých 15 minut se s miskami opatrně kývalo. Čas infekce byl počítán od vložení do inkubátoru. Poté bylo k buňkám doplněno médium DMEM s 0,5% sérem. Používaný objem média s virovým inokulem byl pro misky o průměru 10 cm 1 ml, pro jamky 6 jamkové desky 500 µl a pro jamky 24 jamkové desky 200 µl. Do jamek 96 jamkové desky byl virus přidáván v objemu 120 µl a médium již nebylo doplňováno. Čas infekce byl počítán od přidání virového inokula na buňky.

##### Použitá média

**Médium DMEM s 0,5% sérem**

#### **4.2.1.8 Infekce buněk Sf9 rekombinantním bakulovirem**

Konfluentně narostlé buňky Sf9 byly pasážovány v poměru 1:3. Po hodině, kdy došlo k přisednutí buněk na povrch misek, byly buňky infikovány rekombinantním bakulovirovým inokulem. Následně byly misky s buňkami ponechány hodinu na kývačce za mírného kývání (při pokojové teplotě). Poté k nim bylo doplněno médium TNM-FH.



#### 4.2.1.9 Nepřímá imunofluorescence

Z jamek s buňkami narostlými na sklíčkách bylo odsáto médium a buňky byly opláchnuty PBS. Poté byly buňky 25 minut fixovány 3,7% roztokem PFA. Po odsátí PFA byly buňky permeabilizovány 5 minut 0,5% roztokem Tritonu X-100. Poté byly třikrát opláchnuty pomocí PBS. Následně byly inkubovány hodinu s 1% BSA. Poté byly další hodinu inkubovány s primární protilátkou (v objemu 200 µl na jamku 24 jamkové desky). Poté byly buňky promyty 3 x PBS po 10 minutách. Dále byly inkubovány se sekundární protilátkou (rovněž v objemu 200 µl). Počínaje touto inkubací byly buňky chráněny před světlem. Pak byly znovu opláchnuty 3 x PBS po 10 minutách. Sklíčko s buňkami pak bylo odebráno z jamek a namočeno do destilované vody. Po uschnutí bylo položeno stranou s buňkami na kapku 70% glycerolu s DAPI na podložním skle. Vzorky pak byly pozorovány pomocí fluorescenčního mikroskopu a byla provedena jejich fotodokumentace.

##### Použité roztoky

**PBS**

**3,7% PFA v PBS (w/v)**

**0,5% Triton X-100 v PBS (v/v)**

**1% BSA v PBS (w/v)**

**70% glycerol (v/v) s DAPI**

**Protilátky ředěné v PBS**

##### Použité přístroje

**Fluorescenční mikroskop IX71**  
(Olympus)

#### 4.2.2 Práce s DNA a RNA

##### 4.2.2.1 Agarózová elektroforéza

Agarózový gel o 2% koncentraci (w/v) byl připraven povařením agarózy v pufru TAE. Poté byla do gelu vmíchána fluorescenční barva barvicí nukleové kyseliny a gel byl nalit do plastového bloku s vloženým hřebenem pro vytvoření jamek. Gel byl ponechán asi 20 minut ztuhnout. Poté byl gel přenesen do elektroforetické aparatury a přelit pufrem TAE. Jednotlivé vzorky DNA byly smíchány s nanášecí barvou. Poté byly vzorky naneseny do jamek v gelu a pro určení velikosti rozdělených fragmentů DNA byl do jedné jamky nanesen standard molekulové hmotnosti. Elektroforetické dělení pak probíhalo při intenzitě elektrického pole 5 V/cm. Po ukončení elektroforézy byla v UV transiluminátoru provedena fotodokumentace gelů.

#### Použité roztoky a chemikálie

**Pufr TAE:** 40mM Tris, 20mM kyselina octová, 1mM EDTA

**Barva nukleových kyselin:** GelRed™

**Nanášecí barva:** 10 x Loading Buffer

**Standard molekulové hmotnosti**

#### Použité přístroje

**Elektroforetická aparatura** (Cleaver Scientific)

**UV transiluminátor InGenius3**  
(Syngene)

#### **4.2.2.2 Izolace RNA z buněk**

Z buněk na 6 jamkové desce bylo odsáto médium a pak byly opláchnuty roztokem versenu. Poté k nim bylo přidáno 200 µl roztoku trypsinu a deska byla umístěna v inkubátoru při 37 °C přibližně 5 minut. Potom byl do jamek přidán 1 ml média DMEM s 10% sérem a buňky byly převedeny do mikrozkuřavky. Dále byly vzorky centrifugovány na stolní centrifuze (4 min, 700 g). Supernatant byl odstraněn a z takto připraveného buněčného peletu byla izolována RNA s využitím soupravy High Pure RNA Isolation Kit. Se soupravou se pracovalo podle návodu od výrobce.

#### Použité roztoky a média

**Roztok versenu**

**Roztok trypsinu**

**Médium DMEM s 10% sérem**

#### Použité přístroje a komerční soupravy

**Stolní centrifuga Spectrafuge 24D**  
(Labnet)

**High Pure RNA Isolation Kit (Roche)**

#### **4.2.2.3 Měření koncentrace RNA**

Koncentrace RNA byla stanovena pomocí přístroje Nanodrop. Práce s přístrojem probíhala podle přiloženého návodu.

#### Použité přístroje

**NanoDrop 2000** (Thermo Scientific)

#### **4.2.2.4 Přepis RNA do cDNA**

Pro reakci byla využita komerční souprava iScript™ cDNA Synthesis Kit. Příprava 20 µl reakčních směsí a reverzní transkripce proběhly podle návodu poskytnutého výrobcem. Pro jednu reakci bylo použito 400 ng RNA.

#### Použité přístroje a komerční soupravy

**iScript™ cDNA Synthesis Kit** (Biorad)

**Termocykler GenePro** (Bioer)

#### 4.2.2.5 PCR

Byla připravena reakční směs o objemu 20 µl.

Složení reakční směsi:

- 2 µl 10x koncentrovaného pufru pro Vent polymerázu
- 0,6 µl 10µM přímého „forward“ primeru
- 0,6 µl 10µM zpětného „reverse“ primeru
- 0,4 µl 10 mM dNTP
- 1 µl cDNA
- 0,2 µl DNA polymerázy Vent
- 15,2 µl ddH<sub>2</sub>O

Reakční program:

| Krok | Počet opakování | Teplota | Doba trvání |
|------|-----------------|---------|-------------|
| 1    | 1x              | 94 °C   | 3 min       |
| 2a   | 30x             | 94 °C   | 30 s        |
| 2b   |                 | 56 °C   | 30 s        |
| 2c   |                 | 72 °C   | 20 s        |
| 3    | 1x              | 72 °C   | 5 min       |

Stejný postup byl použit i pro gradientovou PCR. Reakční program se lišil pouze v jediném kroku – místo teploty nasedání primerů 56 °C byl nastaven teplotní gradient od 56,5 °C do 64 °C.

Výsledný produkt byl ověřen elektroforetickým rozdělením na agarózovém gelu.

#### Použité přístroje

**Termocykler GenePro (Bioer)**

#### 4.2.2.6 Kvantitativní PCR (qPCR)

Byla připravena reakční směs o objemu 11 µl.

Složení reakční směsi:

- 5 µl 2x koncentrovaný LightCycler® 480 SYBR Green I Master (*součástí komerční soupravy*)
- 0,3 µl 10µM přímého „forward“ primeru
- 0,3 µl 10µM zpětného „reverse“ primeru
- 1 µl cDNA
- 4,4 µl H<sub>2</sub>O PCR grade (*součástí komerční soupravy*)

Reakční směs byla přenesena do jamky na desce (Light-Cycler 480 Multiwelle Plate 383, Roche). Detekce probíhala pomocí přístroje LightCycler® 480 Instrument II.

Reakční program:

| Krok        | Počet opakování | Teplota | Doba trvání |
|-------------|-----------------|---------|-------------|
| Preinkubace | 1x              |         |             |
|             |                 | 95 °C   | 5 min       |
| Amplifikace | 40x             |         |             |
|             |                 | 95 °C   | 10 s        |
|             |                 | 58 °C   | 20 s        |
|             |                 | 72 °C   | 30 s        |
| Křivka tání | 1x              |         |             |
|             |                 | 72 °C   | 5 min       |
|             |                 | 65 °C   | 1 min       |
|             |                 | 97 °C   |             |
| Chladnutí   | 1x              |         |             |
|             |                 | 37 °C   | 10 min      |

Analýza křivky tání a relativní kvantifikace vůči referenčnímu genu byla provedena s využitím softwaru LightCycler® 480 Software.

Použité komerční soupravy a přístroje

**LightCycler® 480 Instrument II** (Roche)

**LightCycler® 480 SYBR Green I Master** (Roche)

#### 4.2.3 Práce s proteiny

##### 4.2.3.1 Měření koncentrace proteinů metodou Bradfordové

Nejprve byly připraveny kalibrační standardy BSA v PBS. Pro kalibraci byly zvoleny standardy o koncentraci 0; 0,25; 0,5; 0,75 a 1 mg/ml.

Vzorky pro měření koncentrace proteinu byly připraveny tak, že ve zkumavce byl smíchán 1 ml činidla Bradfordové s 20 µl standardu nebo experimentálního vzorku vhodně naředěného v PBS. Tato směs byla inkubována při pokojové teplotě po dobu 5 minut. Následně byla spektrofotometricky změřena absorbance jednotlivých standardů a vzorků při vlnové délce 595 nm. Z hodnot absorbance standardů byla vytvořena kalibrační křivka a pomocí rovnice regrese byla vypočítána koncentrace proteinů ve vzorcích.

#### Použité roztoky

**Činidlo Bradfordové:** Coomassie Brilliant Blue (0,1 mg/ml), 10% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (v/v), 5% ethanol (v/v)

**PBS**

#### Použité přístroje

**Spektrofotometr** (Thermo Electron Corporation)

#### **4.2.3.2 Příprava buněčného lyzátu**

Z Petriho misky s buňkami bylo odsáto médium a buňky byly opláchnuty pomocí PBS vychlazeného na teplotu 4 °C. K buňkám byl přidán 1 ml vychlazeného PBS a miska byla umístěna na led. Poté byly buňky seškrabány a převedeny do zkumavky. Buněčná suspenze pak byla centrifugována (6 min, 800 g, 4 °C). Supernatant byl odstraněn a pelet byl na ledu rozplaven ve 200 µl pufru RIPA s přidáním koktejlem inhibitorů proteáz cOmplete Mini, EDTA-free. Směs byla promíchána a inkubována 30 minut na ledu. Poté byla sonikována ručním sonikátorem 3 x 10 sekund, přičemž mezi jednotlivými sonikacemi byly vzorky chlazeny 30 sekund na ledu. Následně byla směs centrifugována na stolní centrifuze (15 min, 16 000 g, 4 °C). Supernatant byl uschován v -20 °C a pelet byl vyhozen.

#### Použité roztoky:

**PBS**

**Pufr RIPA:** 50mM Tris-HCl (pH=7,4), 5mM EDTA, 150mM NaCl, 1% NP-40 (v/v), 0,5% deoxycholát sodný (w/v), 0,1% SDS (w/v)

**Koktejl inhibitorů proteáz:** 1 tableta cOmplete Tablets, Mini EDTA-free na 10 ml

#### Použité přístroje:

**Centrifuga Universal 320/320R**, rotor 1619 (Hettich)

**Ruční sonikátor** (Hielscher)

**Stolní centrifuga Spectrafuge 24D** (Labnet)

#### **4.2.3.3 Denaturační polyakrylamidová elektroforéza (SDS-PAGE)**

Byla sestavena aparatura pro přípravu polyakrylamidových gelů a utěsněna. Mezi skla aparatury byl nalit 10% gel (asi do  $\frac{3}{5}$  výšky skel). Gel pak byl převrstven destilovanou vodou. Po polymerizaci gelu (asi po 30 minutách) byla voda z aparatury vylita a mezi skla byl nalit 5% zaostřovací gel. Ihned poté byl mezi skla vložen hřeben pro vytvoření jamek a gel byl ponechán asi 20 minut ztuhnout. Skla s gely pak byla umístěna do elektroforetické aparatury a zalita pufrem pro elektroforézu.

| Rozpis pro přípravu 10% a 5% gelu, objemy odpovídají přípravě dvou gelů. |         |         |
|--|---------|---------|
|  | 10% gel | 5% gel  |
| ddH <sub>2</sub> O   | 3,25 ml | 4,22 ml |
| Směs 29% akrylamid (w/v)<br>+ 1% bis-akrylamid (w/v)                     | 4 ml    | 1 ml    |
| 1M Tris-HCl (ph = 8,8)   | 4,5 ml  |         |
| 1M Tris-HCl (ph = 6,8)   |         | 750 µl  |
| 10% SDS (w/v)  | 120 µl  | 60 µl   |
| 10% persíran amonný (w/v)  | 40 µl   | 40 µl   |
| TEMED  | 8,5 µl  | 10 µl   |

Jednotlivé vzorky byly smíchány s 5x koncentrovaným pufrém Laemmli v poměru 4 : 1 a poté 5 minut vařeny při 100 °C. Pak byly nanесeny do jamek vytvořených hřebem. Standard molekulové hmotnosti Prestained Molecular Weight Marker byl před nanесením vařen 1 minutu. Elektroforéza probíhala nejdříve 30 minut při intenzitě elektrického pole 8 V/cm<sup>2</sup> a poté při intenzitě elektrického pole 10 V/cm<sup>2</sup> přibližně 2 hodiny.

#### Použité roztoky

**Pufr pro elektroforézu:** 25mM Tris,  
192mM glycin, 0,01% SDS (w/v)

**Pufr Laemmli (1x):** 1% SDS (w/v),  
10mM Tris-HCl (pH = 6,8),  
5% β-merkaptoethanol (v/v),  
10% glycerol (v/v),  
0,001% bromfenolová modř

**Standard molekulové hmotnosti**

#### Použité přístroje

**Elektroforetická aparatura a aparatura pro přípravu gelů (Hoefer)**

#### 4.2.3.4 Barvení polyakrylamidového gelu po SDS-PAGE

Polyakrylamidový gel byl omyt v destilované vodě (3 x 5 min) a poté hodinu inkubován v roztoku barvy GelCode™ při pokojové teplotě za stálého kývání. Následně byl opláchnut destilovanou vodou (3 x 10 min).

#### Použité roztoky

**GelCode™ Blue Stain Reagent**

#### 4.2.3.5 Western blot

Po proběhnutí SDS-PAGE byl polyakrylamidový gel vyjmut z aparatury a 10 minut inkubován v blotovacím pufru. V blotovacím pufru byla inkubována rovněž nitroceluózová membrána (GE Healthcare) (5 min). Poté byl v nádobě s blotovacím pufrem sestaven tzv. blotovací sendvič v pořadí: molitan, 4 x filtrační papír, 1 x papír Whatman, polyakrylamidový gel, nitroceluózová membrána, 1 x papír Whatman, 4 x filtrační papír a molitan.

Takto připravený blotovací sendvič byl uzavřen do plastové mřížky, vložen do aparatury pro Western blot a zalit blotovacím pufrem vychlazeným na 4 °C. Přenos proteinů na membránu probíhal 3 hodiny při 0,8 mA/cm<sup>2</sup>. Poté bylo přikročeno k imunodetekci proteinů imobilizovaných na membráně.

##### Použité roztoky

**Blotovací puf:** 25mM Tris, 192mM glycín, 20% methanol (v/v)

##### Použité přístroje

**Aparatura pro Western blot TE22**  
(Amersham Biosciences)

#### 4.2.3.6 Dot blot

Na nitroceluózovou membránu (GE Healthcare) byly po 1,5 µl nakapány vzorky a membrána byla ponechána uschnout. Poté proběhla imunologická detekce proteinů imobilizovaných na membráně.

#### 4.2.3.7 Imunologická detekce proteinů imobilizovaných na membráně

##### 4.2.3.7.1 Navázání protilátek

První kroky imunologické detekce proteinů imobilizovaných na membráně vedly k vazbě primární protilátky na detekovaný protein a následné vazbě se sekundární protilátkou.

Membrána byla přes noc inkubována v 5% odtučněném mléce při 4 °C. Následně byla hodinu inkubována s primární protilátkou ředěnou v 5% mléce. Protilátka byla odmyta třemi inkubacemi membrány v PBS + Tween-20 po 10 minutách. Dále byla membrána inkubována se sekundární protilátkou ředěnou v 5% mléce po dobu 30 minut. Sekundární protilátka byla rovněž odmyta 3 x PBS + Tween-20 po 10 minutách. Kromě první inkubace probíhaly výše uvedené kroky při pokojové teplotě a za stálého kývání na kývačce.

#### Použité roztoky

**PBS + Tween-20:** PBS s přidaným roztokem Tween-20, finální koncentrace Tween-20 = 0,1% (v/v)

**5% odtučněné mléko v PBS + Tween-20 (w/v)**

**Primární a sekundární protilátky ředěné v 5% mléce**

#### **4.2.3.7.2 Vizualizace signálu vyvoláním na rentgenový film nebo pomocí přístroje Amersham Imager 600**

Následně bylo přikročeno k vyvolání signálu. Membrána byla 30 vteřin inkubována v roztocích A a B smíchaných v poměru 1 : 1 těsně před vložením membrány.

Při vyvolávání na rentgenový film byla membrána vložena do průhledné fólie umístěné ve vyvolávací kazetě. Na fólii byl poté přiložen rentgenový film (Agfa) po zvolenou dobu expozice. (Délka expozice se pohybovala mezi 30 vteřinami a 2 minutami.) Následně byl film pro vyvolání signálu ponořen postupně do vývojky a ustalovače. Vyvolání signálu na rentgenový film proběhlo v temné komoře. Tato forma vyvolání byla použita pouze u obrázku 9, v ostatních případech byl signál vizualizován pomocí přístroje Amersham Imager 600. Při práci s přístrojem bylo postupováno podle návodu od výrobce.

#### Použité roztoky

**Roztok A:** 0,1M Tris-HCl (pH = 8,5),  
250 mM luminol, 90 mM kyselina  
p-kumarová

**Roztok B:** 0,1M Tris-HCl (pH = 8,5),  
0,03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (v/v)

**Vývojka**

**Ustalovač**

#### Použité přístroje

**Amersham Imager 600** (GE  
Healthcare)



#### 4.2.4 Izolace myšího polyomaviru

##### 4.2.4.1 Příprava a infekce buněk

Buňky 3T6 konfluentně narostlé na miskách o průměru 6 cm byly pasážovány v poměru 1 : 6 na 10 misek o průměru 10 cm. Do několika misek bylo předem vloženo sterilní mikroskopické sklíčko o průměru 12 mm, aby bylo možné sledovat průběh infekce. Misky s buňkami byly ponechány v inkubátoru pro savčí kultury.

Následující den, kdy konfluence buněk dosahovala zhruba 40 %, byly buňky infikovány myším polyomavirem MOI: 0,1. Misky s buňkami byly 5 dní ponechány v inkubátoru. 2 dny a 4 dny po infekci byl průběh infekce ověřen pomocí nepřímého imunofluorescenčního značení virového LT antigenu.

Po 5 dnech byly buňky infikované myším polyomavirem byly nejprve třikrát zmrazeny v -80 °C a poté opět rozmrazeny. Takto bylo zajištěno rozbití buněk. Následně byla suspenze zbytků buněk a viru seškrabána z misek a přenesena do 50ml falkon. Poté byla suspenze centrifugována (30 min, 8 000 g, 4 °C). Supernatant byl odebrán do sterilní nádoby a uchováván ve 4 °C. Sediment byl resuspendován ve 2 ml pufru B a homogenizován ve skleněném homogenizátoru. Během homogenizace byl homogenizátor umístěn na ledu.

K homogenátu byl poté přidán inhibitor proteáz aprotinin a také neuraminidáza. Poté byl inkubován přes noc v laboratorní teplotě za pomalého kývání na kývačce. Následující den byla suspenze centrifugována (30 min, 8 000 g, 4 °C). Supernatant byl přidán k supernatantu z předchozího dne, zatímco pelet byl resuspendován ve 2 ml 10mM Tris-HCl (pH = 9) a inkubován 4 hod v laboratorní teplotě za kývání na kývačce. Tato suspenze pak byla opět centrifugována (30 min, 8 000 g, 4 °C). Supernatant byl spojen se supernatanty získanými při předchozích centrifugacích a pelet byl vyhozen.

##### Použité roztoky a enzymy

**Pufr B**

**10 mM Tris-HCl (pH=9)**

**Aprotinin (2 µg/ml)**

**Neuraminidáza (0,01 U/ml)**

##### Použité přístroje

**Centrifuga 3K30, rotor 19776-H**  
(Sigma)

##### 4.2.4.2 Centrifugace přes sacharózový polštář

Virová suspenze byla následně zahuštěna a přečištěna centrifugací přes 10% sacharózový polštář. Supernatant byl rozdělen do tří ultracentrifugačních zkumavek a podvrstven přibližně 3 ml 10% sacharózy. Zkumavky byly doplněny a vyváženy pufrům B. Poté byly centrifugovány

na ultracentrifuze Beckman (rotor SW32, 25 000 RPM, 3 hod, 4 °C). Supernatant byl odstraněn a sediment byl přes noc rozplavován v 1 ml pufru B při teplotě 4 °C. Následující den byl sediment homogenizován na ledu ve skleněném homogenizátoru.

#### Použité roztoky

##### **Pufr B**

**10% sacharóza v pufru B (w/v)**

#### Použité přístroje

**Ultracentrifuga Optima XPN-90, rotor SW32 (Beckman)**

#### **4.2.4.3 Izopyknická centrifugace v CsCl gradientu**

Homogenní suspenze byla posléze přečištěna centrifugací v CsCl gradientu. Suspenze byla spojena s CsCl v hmotnostním poměru 2,5 : 1,2 následujícím způsobem: Do centrifugačních zkumavek bylo odváženo 3,79 g CsCl a přidáno 7,9 g virové suspenze. Rozpuštění CsCl bylo usnadněno pomalým otáčením zkumavek. Koncentrace CsCl byla poté ověřena změřením refraktometrického indexu, který by se měl pohybovat mezi 1,363 – 1,366, což odpovídá výsledné hustotě roztoku 1,33 g/ml.

Směs byla poté převrstvena a vyvážena parafinovým olejem a pak centrifugována na ultracentrifuge Beckman (rotor SW41, 35 000 RPM, 20 hod, 18 °C). Vzniklý gradient byl pomocí rozebírače frakcí rozdělen do zkumavek po objemu přibližně 500 µl. U všech frakcí byl změřen refraktometrický index a proveden imunologický test přítomnosti virového proteinu VP1 pomocí metody dot blot. Na základě výsledku těchto testů byly vybrány některé frakce a tyto byly spojeny do dvou větších frakcí. Těmi byly frakce nabohacená o plné virové partikule (odpovídá refraktometrickému indexu 1,365 – 1,366) a frakce obohacená o prázdné virové partikule (odpovídá refraktometrickému indexu 1,362 – 1,363).

#### Použité přístroje:

**Abbé Refraktometr (Opting servis)**

**Rozebírač frakcí (Beckman)**

**Ultracentrifuga Optima XPN-90, rotor SW41 (Beckman)**

#### **4.2.4.4 Dialýza**

Chlorid cesný byl z virových frakcí odstraněn dialýzou v dialyzačním střevě v přítomnosti pufru B. Dialyzační střevo (Serva) byla nejdříve 10 minut vařena ve vroucí destilované vodě. Poté do nich byly převedeny virové frakce (virová suspenze byla v membráně dialyzačního střeva uzavřena pomocí dialyzačních svorek) a střevo byla vložena do nádoby se dvěma litry

vychlazeného pufru B. Dialýza probíhala při 4 °C. Po 30 minutách byl pufr B vyměněn za nový a dialýza dále pokračovala přes noc.

Po dialýze byla virová suspenze znovu zahuštěna centrifugací přes sacharózový polštář (kapitola 4.2.4.2). Supernatant byl odstraněn a sediment byl přes noc rozplavován ve 200 µl pufru B při teplotě 4 °C. Následující den byl sediment homogenizován na ledu ve skleněném homogenizátoru. Získaná virová suspenze byla uchovávána v silikonové zkumavce v -20 °C.

#### Použité roztoky

##### **Pufr B**

#### **4.2.4.5 Určení infekčního titru pomocí imunofluorescence**

Buňky 3T6 byly kultivovány na mikroskopických sklíčkách ve 24 jamkové desce do chvíle, kdy jejich konfluence dosahovala přibližně 40 %. Poté byly infikovány myším polyomavirem ředěným v médiu DMEM bez séra. Byla testována různá ředění virového inokula: 100x, 1 000x, 10 000x a 100 000x. 24 hodin po infekci bylo provedeno značení virového proteinu LT pomocí nepřímé imunofluorescence. Poté byl pod fluorescenčním mikroskopem BX-60 (Olympus) spočítán počet infikovaných buněk. Infekční titr viru byl poté vypočítán podle vzorce:

$$\text{Počet infekčních virových částic na 1 ml} = \bar{x} \times \text{faktor zvětšení mikroskopu} \times \text{výchozí ředění suspenze} \times 5$$

Kde  $\bar{x}$  = průměrný počet infikovaných jader na zorné pole při daném zvětšení. Faktor zvětšení mikroskopu činil 844 pro zvětšení 400 x nebo 211 pro zvětšení 200 x.

#### **4.2.4.6 Hemaglutinační test**

Morčecí krev byla 3 x promyta 0,2% BSA v PBS a po každém promytí centrifugována na centrifuze 3K30 (20 min, 850 g, 4 °C). Sediment byl resuspendován 0,2% BSA v PBS. Koncentrace krvinek byla zjištěna hematokritem. 30 µl suspenze krvinek bylo přeneseno do kapiláry, která byla na obou koncích zatavena. Kapiláry pak byly centrifugovány na centrifuze MPW 300 (5 min) a následně byl odečten hematokrit odečten jako procentuální vyjádření výšky sloupce PBS k výšce sloupce erytrocytů. Suspenze erytrocytů pak byla naředěna 0,2% BSA v PBS na konečnou koncentraci 0,4%.

Do jamek mikrotitrační destičky s jamkami ve tvaru U bylo napipetováno 50 µl 0,2% BSA v PBS. Do jedné jamky bylo nanášeno 50 µl vzorku (MPyV nebo VLPs) vhodně naředěného v 0,2% BSA v PBS a suspenze byla důkladně promíchána. Vzorek byl dále naředěn dvojkovou řadou následujícím způsobem: Z jamky bylo odebráno 50 µl a přeneseno do následující jamky, odkud bylo po promíchání opět odebráno 50 µl a přidáno do další jamky. Tento postup byl

opakován až do poslední jamky ředící řady (ze které bylo po promíchání 50 µl suspenze odstraněno).

Poté bylo do všech jamek přidáno 50 µl 0,4% suspenze morčecích krvinek a destička byla ponechána ve 4 °C. Následující den byl výsledný počet hemaglutinačních jednotek (HAU) ve vzorku vypočítán na základě nejvyššího ředění vzorku, kde docházelo k aglutinaci podle vzorce

$$HAU = \text{ředění vzorku} \times 2^{(n+1)},$$

kde n = počet jamek s pozitivní hemaglutinací.

Výpočet hemaglutinačního titru byl poté proveden podle vzorce

$$1 \text{ HAU} = 1 \times 10^7 \text{ virových částic/ml.}$$

#### Použité roztoky

**0,2% BSA v PBS (w/v)**

**0,4% suspenze morčecích krvinek**

**v 0,2% BSA v PBS (v/v)**

#### Použité přístroje

**Centrifuga 3K30**, rotor 19776-H  
(Sigma)

**Centrifuga MPW 300**, rotor CM-304  
(Mechanika Precyzyjna)

#### **4.2.4.7 Elektronová mikroskopie a negativní barvení**

Měděná mikroskopická síťka potažená parlodionovou pouhlikovanou membránou byla nejprve inkubována 7 minut na 10µl kapce vzorku. Poté byla 2 x 30 sekund inkubována na 100µl kapce ddH<sub>2</sub>O. Následovaly dvě minutové inkubace na 50µl kapce 2% kyseliny fosfowolframové. Poté byla ze síťky pomocí filtračního papíru odsáta přebytečná tekutina a síťka byla ponechána uschnout. Pak byly vzorky pozorovány pomocí elektronového mikroskopu.

#### Použité roztoky

**2% kyselina fosfowolframová (w/v)**  
(pH = 7,2)

#### Použité přístroje

**Elektronový mikroskop JEOL JEM 1200EX**

#### **4.2.5 Izolace VP1 VLPs**

Deset misek buněk Sf9 o průměru 10 cm bylo infikováno rekombinantním bakulovirovým inokulem VL-VP1. Po infekci byly buňky kultivovány tři dny. Poté byly buňky seškrabány pryžovým škrabátkem z povrchu misek a buněčná suspenze byla centrifugována (6 min, 200 g). Supernatant byl odstraněn a pelet byl resuspendován v 10 ml PBS. Poté byla suspenze znovu centrifugována (6 min, 200 g) a následně byl odstraněn supernatant. Pelet byl resuspendován v 10 ml pufru B. Buněčná suspenze v pufru B pak byla na ledu sonikována skříňovým

sonikátorem 3 x 30 s při amplitudě 10  $\mu$ m. Mezi sonikacemi byla suspenze ponechána minutu na ledu. V následujících krocích se postup v různých izolacích lišil podle toho, jaký důraz byl kladen na koncentraci získané suspenze VP1 VLPs.

#### Použité roztoky

**PBS**

**Pufr B**

#### Použité přístroje

**Centrifuga Universal 320/320R**, rotor  
1619 (Hettich)

**Sonikátor Soniprep 150** (Schoeller)

#### **4.2.5.1 Příprava nekoncentrované suspenze VP1 VLPs**

Po sonikaci byla suspenze centrifugována (15 min, 8 000 g, 4 °C). Pelet byl odstraněn a supernatant byl centrifugován v gradientu CsCl na ultracentrifuze Beckman (rotor SW41, 35 000 RPM, 20 hod, 18 °C). Po centrifugaci byl v centrifugační zkumavce pozorovatelný proužek v místě, kam v gradientu doputovaly VP1 VLPs. Na základě jeho polohy byla z centrifugační zkumavky pomocí injekční stříkačky vypíchnuta suspenze s VP1 VLPs o objemu asi 1 ml. Následně byl z této suspenze odstraněn CsCl dialýzou.

Použité metody jsou detailněji rozepsány v kapitolách 4.2.4.3 a 4.2.4.4.

#### **4.2.5.2 Příprava koncentrované suspenze VP1 VLPs**

Po sonikaci byla suspenze centrifugována (15 min, 8 000 g, 4 °C). Pelet byl odstraněn a supernatant byl centrifugován v gradientu CsCl na ultracentrifuze Beckman (rotor SW41, 35 000 RPM, 20 hod, 18 °C). Vzniklý gradient byl rozdělen do frakcí. Vybrané frakce byly spojeny na základě refraktometrického indexu a výsledku detekce proteinu VP1 ve frakcích pomocí metody dot blot. Z těchto spojených frakcí byl CsCl odstraněn dialýzou a poté byly tyto suspenze zakoncentrovány pomocí ultracentrifugace přes sacharózový polštář. Sediment po ultracentrifugaci byl rozplaven ve 100  $\mu$ l pufru B.

Použité metody jsou detailněji rozepsány v kapitolách 4.2.4.2 – 4.2.4.4.

### **4.2.6 Izolace VP1/3 VLPs**

#### **4.2.6.1 Transfekce buněk 3T6 metodou nukleofekce**

Konfluentně narostlé buňky 3T6 byly pasážovány v poměru 1:5. Následující den, kdy konfluence buněk dosahovala asi 70 %, bylo z buněk odsáto médium a byly opláchnuty roztokem versenu. Poté k nim byl přidán roztok trypsinu a misky s buňkami byly inkubovány 5 minut při 37 °C. Následně bylo k buňkám přidáno médium DMEM s 10% sérem. Buňky byly počítány v počítači komůrce (Assistant) a byla odebrána buněčná suspenze odpovídající

4 x 10<sup>6</sup> buněk. (Celkem bylo připraveno pět transfekčních směsí po 4 x 10<sup>6</sup> buněk.) Suspenze byla centrifugována (6 min, 200 g) při pokojové teplotě. Supernatant byl odstraněn a pelet byl resuspendován ve 100 µl nukleofekčního roztoku. Poté byly k suspenzi přidány 3 µg plazmidu kódujícího protein MPyV VP1 a 3 µg plazmidu kódujícího virový protein VP3. Směs byla promíchána a přenesena do elektroporační kyvety (2,5 mm, Lonza). Kyveta byla vložena do elektroporátoru a do buněk byl aplikován elektrický pulz. Pro transfekci buněk 3T6 byl použit program T-030. Ihned po aplikaci pulzu bylo k buňkám přidáno 500 µl média RPMI-1640. Buněčná suspenze pak byla přenesena do mikrozkušavky a inkubována 15 minut při 37 °C. Poté byla opatrně resuspendována a přidána na misky o průměru 10 cm s médiem DMEM s 10% sérem. Do několika z těchto misek bylo předem vloženo sterilní mikroskopické sklíčko o průměru 12 mm, aby bylo možné sledovat produkci proteinů. Po pěti hodinách bylo médium odsáto a k buňkám bylo přidáno čerstvé médium DMEM s 10% sérem.

#### Použité roztoky

**Roztok versenu**

**Roztok trypsinu**

**Médium DMEM s 10% sérem**

**Médium RPMI-1640**

**Nukleofekční roztok Nucleofector™**

**Solution V** (*součástí komerční soupravy*)

#### Použité přístroje a komerční soupravy

**Cell Line Nucleofector® Kit V**

**Centrifuga Universal 320/320R**, rotor 1619 (Hettich)

**Elektroporátor Amaxa Nucleofector® II** (Lonza)

#### **4.2.6.2 Izolace viru podobných částic**

Kultivace buněk po transfekci pokračovala 3 dny. Poté byly buňky 3 x zmrazeny v -80 °C a opět rozmrazeny. Od tohoto kroku probíhala izolace VP1/3 VLPs stejným postupem jako izolace myšího polyomaviru (po rozbití infikovaných buněk rozmrazováním). Postup je rozepsán v kapitolách 4.2.4.1 – 4.2.4.4.

#### **4.2.7 ELISA**

Metoda ELISA byla využita ke sledování produkce cytokinu IL-6 buňkami myších fibroblastů. Do jamek Maxisorp Nunc-Immuno 96 jamkové destičky (Thermo Scientific) bylo nanášeno 50 µl monoklonální protilátky MT26B2. Následovala inkubace přes noc při 4 °C. Následující den byly jamky nejprve promyty PBS 2 x 200 µl. Poté bylo do všech jamek přidáno 50 µl inkubačního pufru a destička byla inkubována 1 hodinu. Pak byly jamky promyty PBS + Tween-20 5 x 200 µl. Následně bylo do jamek nanášeno 50 µl testovaného vzorku (média) nebo

standardu IL-6. Pro standard byla připravena ředící řada o koncentracích standardu 31,25; 62,5; 125; 250; 500; 1 000 a 2 000 pg/ml. Se vzorky a standardy byla deska inkubována 2 hodiny. Poté byly jamky opět promyty PBS + Tween-20 5 x 200 µl a bylo do nich přidáno 50 µl monoklonální protilátky 32C11 konjugované s biotinem (32C11-biotin). Následně bylo zopakováno promytí PBS + Tween-20 5 x 200 µl. Poté bylo do jamek nanášeno 50 µl streptavidinu konjugovaného s křenovou polymerázou (streptavidin-HRP). Po hodinové inkubaci byly jamky znovu promyty PBS + Tween-20 5 x 200 µl. S výjimkou první inkubace probíhající přes noc byly všechny kroky prováděny při pokojové teplotě.

Po posledním promytí bylo do jamek přidáno 50 µl substrátu TMB. Po 15 minutové inkubaci byla zastavena probíhající reakce přidáním 50 µl 0,2M kyseliny sírové. Poté byla změřena absorbance jednotlivých vzorků při vlnové délce 450 nm pomocí přístroje ELISA reader.

#### Použité roztoky a protilátky

##### **PBS**

##### **PBS + Tween-20: PBS**

s přidáním roztokem Tween-20, finální koncentrace Tween-20 = 0,05% (v/v)

**Inkubační pufr:** 0,1% BSA v PBS + Tween-20 (w/v)

**MT26B2\*** (1 µg/ml, ředěno v PBS)

**IL-6 standard\*** (ředěno v inkubačním pufru)

**32C11-biotin\*** (1 µg/ml, ředěno v inkubačním pufru)

**Streptavidin-HRP\*** (ředěno v inkubačním pufru 1 000 x)

##### **Substrát TMB\***

##### **0,2M Kyselina sírová**

*\*Součástí komerční soupravy*

#### Použité přístroje a komerční soupravy

##### **Mouse IL-6 ELISA development kit**

##### **TMB substrate reagent set**

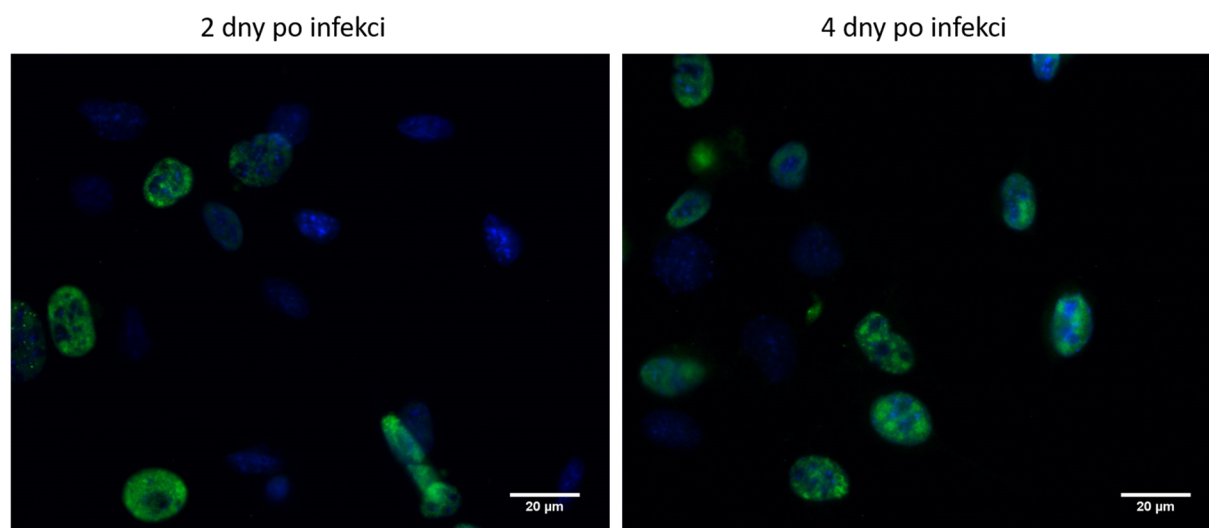
**ELISA reader Infinite® 200PRO**  
(Tecan)

## 5 Výsledky

Před zahájením vlastních pokusů bylo nejprve nutné připravit materiál potřebný pro provedení experimentů. Proto byl nejprve pomnožen a izolován myší polyomavirus, a také připraveny viru podobné částice tvořené virovým proteinem VP1 (VP1 VLPs) a viru podobné částice tvořené virovými proteiny VP1 a VP3 (VP1/3 VLPs).

### 5.1 Izolace MPyV

Pro pomnožení myšího polyomaviru byly virem infikovány buňky 3T6 na deseti miskách o průměru 10 cm. Buňky byly infikovány nízkou multiplicitou (MOI: 0,1) tak, aby došlo k postupné infekci buněk na miskách během několika dní. Průběh infekce byl kontrolován: Do některých misek byla předem vložena mikroskopická sklíčka. Dva dny a čtyři dny po infekci bylo sklíčko z jedné misky odebráno a bylo provedeno značení virového antigenu LT pomocí nepřímé imunofluorescence. Tato metoda umožňuje určit, zda je pozorovaná buňka infikována MPyV. Pozorování pod fluorescenčním mikroskopem ukázalo, že dva dny po infekci bylo virem infikováno přibližně 30 % buněk, zatímco čtyři dny po infekci asi 90 % buněk (Obrázek 8). Během infekce byl také pod světelným mikroskopem pozorován narůstající cytopatický efekt.

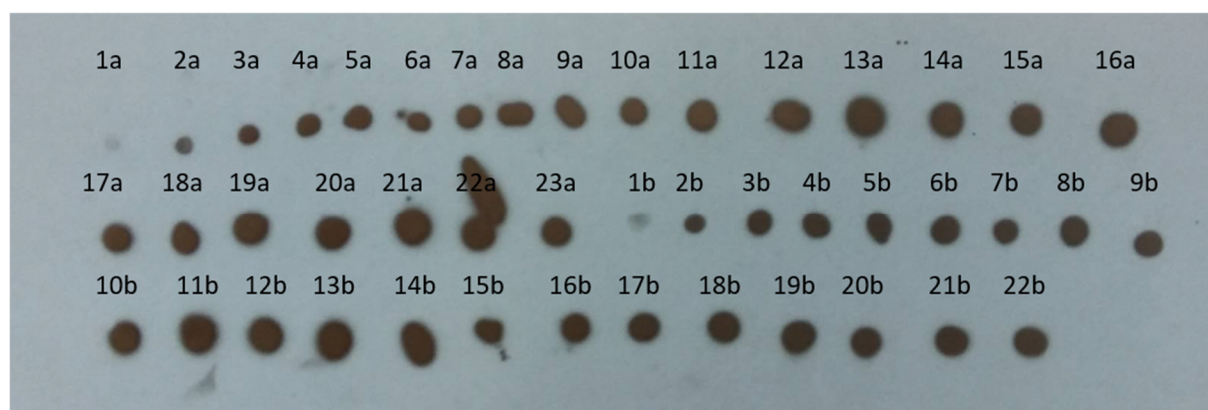


**Obrázek 8: Průběh infekce buněk 3T6 myším polyomavirem**

Buňky 3T6 byly infikovány MPyV (MOI: 0,1). Jádru je zviditelněno modře pomocí DAPI. Protein LT myšího polyomaviru je značen zeleně pomocí kombinace primární protilátky RataLT1 a sekundární protilátky GaR-Ax488. Reprezentativní optická pole.



Infekce byla ukončena po pěti dnech. Z infikovaných buněk a média byl izolován virus centrifugací přes 10% sacharózový polštář a následně centrifugací v gradientu chloridu cesného. Gradienty chloridu cesného byly rozděleny do frakcí a metodou dot blot byla ověřena přítomnost virového proteinu VP1 v jednotlivých frakcích (Obrázek 9). U všech frakcí byl také změřen refraktometrický index a na základě těchto dvou testů byly vybrané frakce (barevně zvýrazněno v tabulce 1) spojeny do frakce obohacené o plné virové částice (frakce II) a frakce obohacené o prázdné částice (frakce III). Obě virové suspenze byly zkoncentrovány centrifugací přes 10% sacharózový polštář a rozplaveny ve 200  $\mu$ l pufru B.



**Obrázek 9: Ověření přítomnosti proteinu VP1 v jednotlivých frakcích gradientu CsCl**

Dot blot frakcí dvou CsCl gradientů. Byla použita primární protilátka proti proteinu VP1 M $\alpha$ VP1-A5 a sekundární protilátka GaM-HRP. Jednotlivé frakce byly očíslovány. Dva gradienty jsou od sebe odlišeny písmeny a a b.

Získané virové suspenze byly charakterizovány stanovením infekčního a hemaglutinačního titru (Tabulka 2). Infekční titr viru – tedy množství infekčních virových částic na 1 ml virové suspenze – byl určen imunologickou detekcí virového proteinu LT 24 hodin po infekci. Hemaglutinační titr udává přibližnou koncentraci veškerých virových částic. Byl stanoven pomocí hemaglutinačního testu, který využívá schopnost proteinu VP1 vázat kyselinu sialovou na povrchu morčecích červených krvinek. Díky této interakci nastává v přítomnosti kapsidových struktur k zesíťování krvinek, a proto nedochází k jejich aglutinaci na dnu jamky. Míra aglutinace erytrocytů odpovídá množství virových částic.

**Tabulka 1: Refraktometrické indexy jednotlivých frakcí CsCl gradientů**

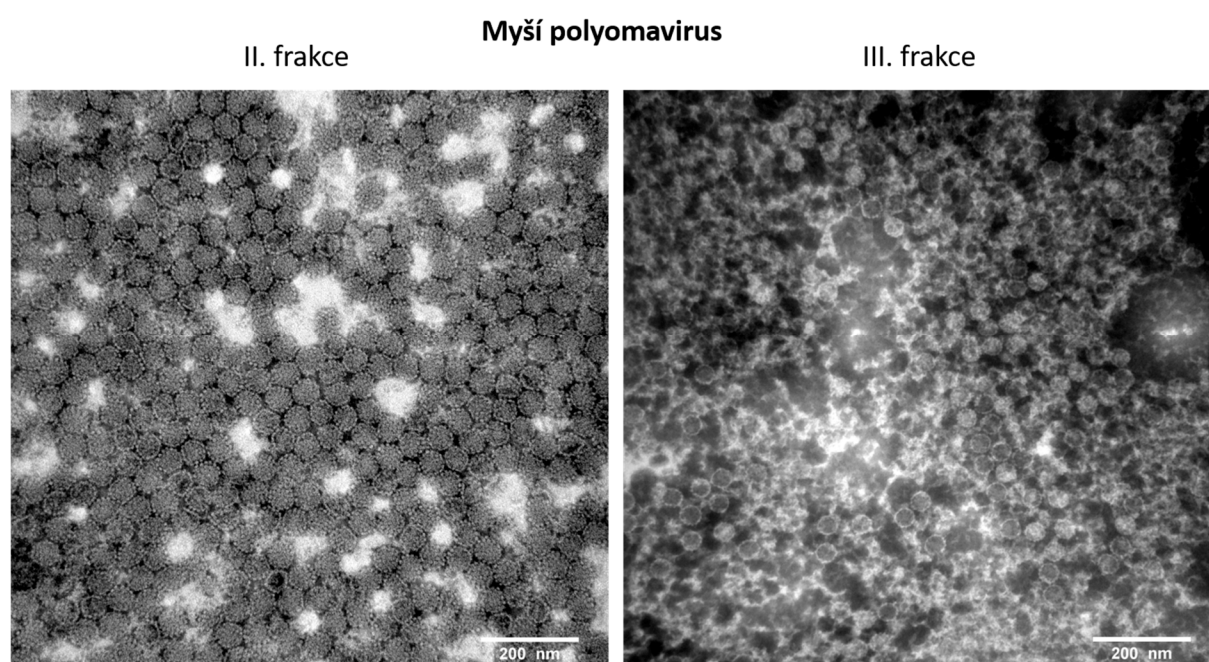
Refraktometrické indexy jednotlivých virových frakcí (dva gradienty jsou od sebe odlišeny písmeny *a* a *b*) a frakcí kontroly (*gradient kontrola*). Žlutě vyznačené frakce byly spojeny do frakce obohacené o plné virové částice označené jako II. frakce a oranžově vyznačené frakce byly spojeny do frakce obohacené o prázdné virové částice označené jako III. frakce. Šedě označené frakce byly spojeny do kontrolního vzorku MII a fialově označené frakce byly spojeny do frakce MIII.

| Číslo frakce | Refraktometrický index |                   |                          |
|--------------|------------------------|-------------------|--------------------------|
|              | <i>Gradient a</i>      | <i>Gradient b</i> | <i>Gradient kontrola</i> |
| 1            | 1,373                  | 1,374             | 1,378                    |
| 2            | 1,373                  | 1,373             | 1,375                    |
| 3            | 1,372                  | 1,370             | 1,371                    |
| 4            | 1,370                  | 1,368             | 1,369                    |
| 5            | 1,369                  | 1,367             | 1,368                    |
| 6            | 1,368                  | 1,367             | 1,367                    |
| 7            | 1,367                  | 1,366             | 1,366                    |
| 8            | 1,367                  | 1,366             | 1,366                    |
| 9            | 1,366                  | 1,365             | 1,365                    |
| 10           | 1,366                  | 1,365             | 1,365                    |
| 11           | 1,365                  | 1,364             | 1,364                    |
| 12           | 1,365                  | 1,364             | 1,364                    |
| 13           | 1,364                  | 1,364             | 1,363                    |
| 14           | 1,364                  | 1,363             | 1,363                    |
| 15           | 1,364                  | 1,363             | 1,362                    |
| 16           | 1,363                  | 1,362             | 1,362                    |
| 17           | 1,363                  | 1,362             | 1,361                    |
| 18           | 1,362                  | 1,361             | 1,360                    |
| 19           | 1,362                  | 1,360             | 1,359                    |
| 20           | 1,361                  | 1,359             | 1,358                    |
| 21           | 1,360                  | 1,358             |                          |
| 22           | 1,359                  | 1,358             |                          |
| 23           | 1,358                  |                   |                          |

**Tabulka 2: Infekční a hemaglutinační titr získaného inokula myšího polyomaviru**

|                                     | Frakce II            | Frakce III           |
|-------------------------------------|----------------------|----------------------|
| Infekční titr [infekční částice/ml] | $1,2 \times 10^9$    | $5,8 \times 10^8$    |
| Hemaglutinační titr [částice/ml]    | $3,3 \times 10^{13}$ | $1,6 \times 10^{12}$ |

Pro ověření kvality izolace byly virové suspenze analyzovány také elektronovou mikroskopií metodou negativního barvení (Obrázek 10). Analýza potvrdila, že II. frakce obsahuje primárně plné virové částice, zatímco ve III. frakci jsou obsaženy zejména prázdné částice. Ve III. frakci bylo rovněž pozorováno i větší množství proteinů nesložených do částic.

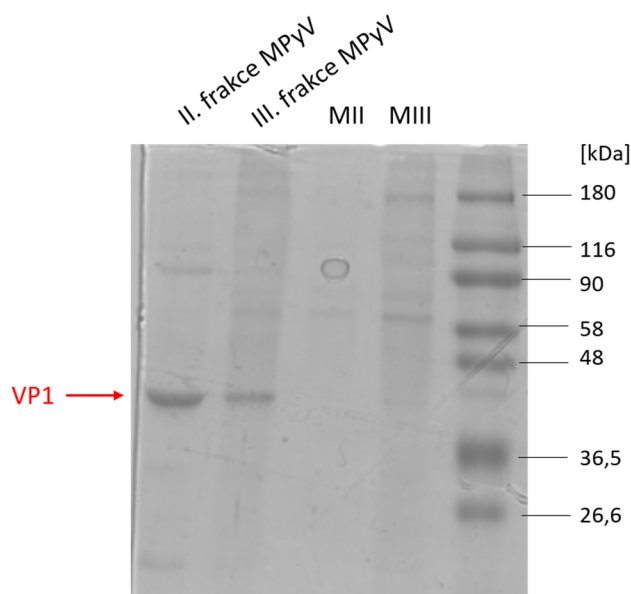


**Obrázek 10: Částice myšího polyomaviru**

Elektronová mikroskopie částic myšího polyomaviru ve II. a III. frakci. Virové částice byly vizualizovány pomocí negativního barvení.

Paralelně byly připraveny také vzorky, které byly v experimentech využívány jako kontrola k virové infekci. Kontrolní vzorky byly připraveny z 5 misek buněk 3T6 (které nebyly infikovány MPyV) stejným způsobem, jakým proběhla izolace viru. Vzorky byly centrifugovány přes 10% sacharózový polštář a následně v gradientu CsCl. Ten byl rovněž rozdělen do frakcí a z těchto byly vybrány frakce spojeny do dvou vzorků na základě refraktometrického indexu (barevně zvýrazněno v tabulce 1). Poté byly tyto dvě frakce (označené jako MII a MIII) centrifugovány přes 10% sacharózový polštář. V pozdějších experimentech byly kontrolní vzorky, ke kterým byla některá z těchto suspenzí přidána místo viru, označovány jako „kontrola MOCK“. Připravený virus i kontrolní vzorky pak byly

analyzovány pomocí SDS-PAGE (Obrázek 11). V obou frakcích myšího polyomaviru představoval nejsilnější signál proužek odpovídající svou mobilitou strukturnímu proteinu VP1.

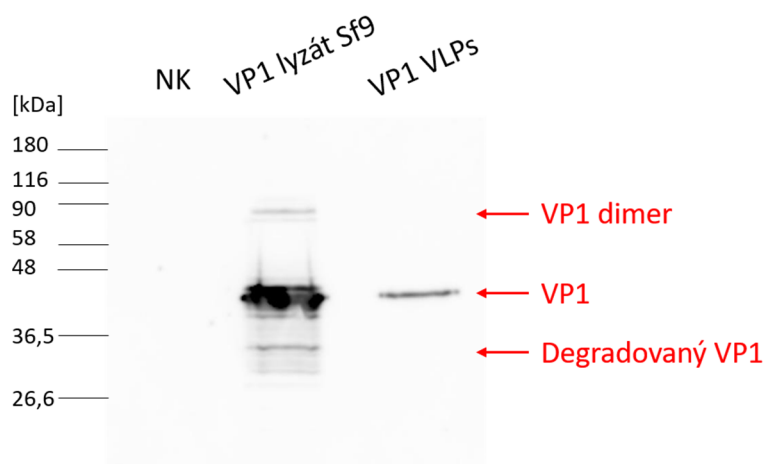


**Obrázek 11: Analýza získaných inokul MPyV a kontrolních vzorků pomocí SDS-PAGE**

Získané frakce MPyV a kontroly (MII a MIII) byly analyzovány denaturační polyakryamidovou elektroforézou. Na SDS-PAGE byl nanesen 1 µg vzorků. Proteiny byly zviditelněny barvou GelCode™. V posledním sloupci se nachází standard molekulové hmotnosti Prestained Molecular Weight Marker (M.W. 26 600 – 180 000 D).

## 5.2 Izolace VP1 VLPs

Deset misek buněk Sf9 o průměru 10 cm bylo infikováno rekombinantním bakulovirem VL-VP1 kódujícím protein VP1 (10 PFU na buňku). Po třech dnech byly z hmyzích buněk izolovány virům podobné částice. VP1 VLPs byly z infikovaného buněčného materiálu izolovány centrifugací v gradientu CsCl. Po centrifugaci byl v centrifugační zkumavce viditelný proužek v místě, kam v gradientu doputovaly VP1 VLPs. Na základě polohy tohoto proužku byla z centrifugační zkumavky injekční stříkačkou vypíchnuta suspenze obsahující viru podobné částice. Poté byl z této suspenze odstraněn CsCl dialýzou. Takto získaná suspenze byla označena VP1 VLPs. Přítomnost proteinu VP1 ve vzorku byla prokázána imunologickou detekcí (Obrázek 12). Hemaglutinačním testem byl určen hemaglutinační titr suspenze (Tabulka 3). Získané VLPs byly dále analyzovány pomocí SDS-PAGE (Obrázek 13) a také elektronovou mikroskopií (Obrázek 14). Elektronová mikroskopie odhalila, že kromě viru podobných částic obsahuje vzorek také velké množství pentamer a dalších komplexů VP1 nesložených do částic.



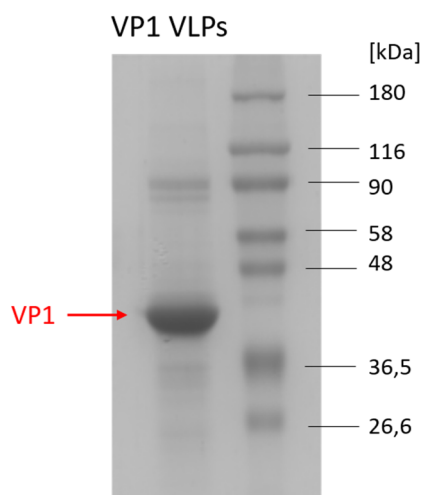
**Obrázek 12: Imunologická detekce proteinu VP1 po izolaci VP1 VLPs**

Přítomnost proteinu VP1 v lyzátu připraveném z buněk Sf9 infikovaných rekombinantním bakulovirem VL-VP1 (označeno VP1 lyzát Sf9) a v připraveném inokulu VP1 VLPs byla prokázána metodami SDS-PAGE a Western blot s následnou imunodetekcí proteinu imobilizovaného na membráně. Jako negativní kontrola (NK) byl použit lyzát buněk Sf9.

Na SDS-PAGE bylo naneseno 10 µg buněčných lyzátů a 10 ng VP1 VLPs. Protein VP1 byl označen pomocí primární protilátky M $\alpha$ VP1 a sekundární protilátky G $\alpha$ M-HRP.

**Tabulka 3: Hemaglutinační titr VP1 VLPs**

|                                  | VP1 VLPs             |
|----------------------------------|----------------------|
| Hemaglutinační titr [částice/ml] | $8,2 \times 10^{10}$ |



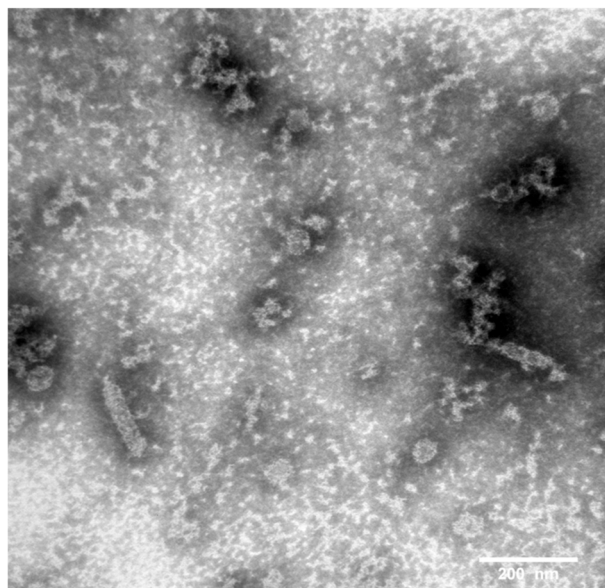
### Obrázek 13: Analýza izolovaných VP1 VLPs pomocí SDS-PAGE

Po izolaci byly VP1 VLPs analyzovány rozdělením na akrylamidovém gelu pomocí SDS-PAGE. Na gel bylo naneseno 5  $\mu$ g vzorku. Proteiny byly zviditelněny barvou GelCode™.

Vyznačen je proužek odpovídající svou mobilitou strukturnímu proteinu VP1.

V posledním sloupci se nachází standard molekulové hmotnosti Prestained Molecular Weight Marker (M.W. 26 600 – 180 000 D).

### VP1 VLPs

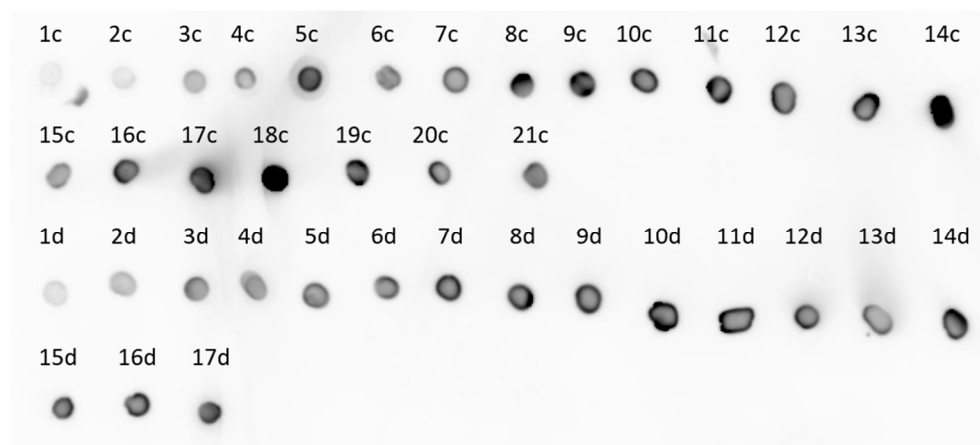


### Obrázek 14: Izolované VP1 VLPs

Elektronová mikroskopie izolovaných VLPs tvořených proteinem VP1. Negativní barvení.

Při experimentální práci s takto připravenými VP1 VLPs bylo zjištěno, že v získané suspenzi nejsou částice pro některé pokusy dostatečně koncentrované (kapitola 5.4.4). Pro přípravu suspenze o vyšší koncentraci částic byla izolace VP1 VLPs zopakována s odlišným protokolem:

Deset misek buněk Sf9 o průměru 10 cm bylo infikováno rekombinantním bakulovirem VL-VP1 (10 PFU na buňku). VP1 VLPs byly z infikovaných buněk izolovány tři dny po infekci centrifugací přes 10% sacharózový polštář a následně centrifugací v gradientu chloridu cesného. Gradienty CsCl byly rozděleny do frakcí. Přítomnost VP1 proteinu ve frakcích byla ověřena imunodetekcí pomocí metody dot blot (Obrázek 15).



**Obrázek 15: Ověření přítomnosti proteinu VP1 ve frakcích gradientu chloridu cesného**

Dot blot. Přítomnost proteinu VP1 myšího polyomaviru ve frakcích dvou CsCl gradientů byla detekována primární protilátkou proti proteinu VP1 M $\alpha$ VP1-A5 a sekundární protilátkou G $\alpha$ M-HRP. Jednotlivé frakce byly očíslovány. Dva gradienty jsou od sebe odlišeny písmeny *c* a *d*.

Také byl změřen refraktometrický index jednotlivých frakcí (Tabulka 4). Podle výsledku těchto dvou testů byly vybrané frakce spojeny do frakce obohacené o plné částice (označena VP1 VLPs II. frakce) a frakce obohacené o prázdné částice (VP1 VLPs III. frakce). Spojení frakcí je barevně zvýrazněno v tabulce 4.

**Tabulka 4: Refraktometrické indexy jednotlivých frakcí CsCl gradientů**

Byly změřeny refraktometrické indexy jednotlivých frakcí CsCl gradientů obsahujících VLPs (dva gradienty jsou od sebe odlišeny písmeny *c* a *d*) a frakcí kontroly (*gradient kontrola Sf9*). Modře vyznačené frakce byly spojeny do frakce obohacené o plné částice označené jako „VP1 VLPs II. frakce“ a zeleně vyznačené frakce byly spojeny do frakce obohacené o prázdné částice označené jako „VP1 VLPs III. frakce“. Šedivě označené frakce byly spojeny do kontrolního vzorku MII Sf9 a fialově označené frakce byly spojeny do frakce MIII Sf9.

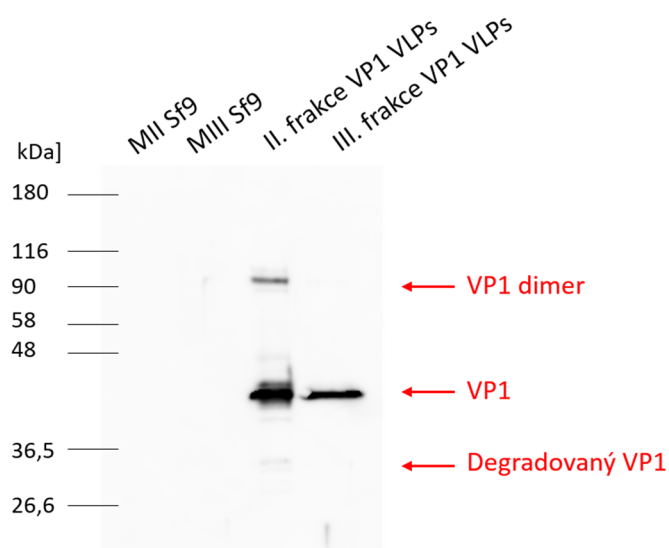
| Číslo frakce | Refraktometrický index |                   |                              |
|--------------|------------------------|-------------------|------------------------------|
|              | <i>Gradient c</i>      | <i>Gradient d</i> | <i>Gradient kontrola Sf9</i> |
|              |                        |                   |                              |
| 1            | 1,374                  | 1,372             | 1,377                        |
| 2            | 1,373                  | 1,370             | 1,373                        |
| 3            | 1,371                  | 1,369             | 1,370                        |
| 4            | 1,369                  | 1,368             | 1,368                        |
| 5            | 1,369                  | 1,367             | 1,367                        |
| 6            | 1,368                  | 1,366             | 1,367                        |
| 7            | 1,367                  | 1,366             | 1,366                        |
| 8            | 1,367                  | 1,365             | 1,366                        |
| 9            | 1,366                  | 1,365             | 1,365                        |
| 10           | 1,366                  | 1,364             | 1,365                        |
| 11           | 1,365                  | 1,364             | 1,365                        |
| 12           | 1,365                  | 1,363             | 1,364                        |
| 13           | 1,364                  | 1,362             | 1,364                        |
| 14           | 1,364                  | 1,361             | 1,363                        |
| 15           | 1,363                  | 1,360             | 1,362                        |
| 16           | 1,363                  | 1,359             | 1,362                        |
| 17           | 1,362                  | 1,359             | 1,361                        |
| 18           | 1,361                  |                   | 1,360                        |
| 19           | 1,360                  |                   | 1,360                        |
| 20           | 1,359                  |                   |                              |
| 21           | 1,358                  |                   |                              |

Přítomnost proteinu VP1 v získaných suspenzích VP1 VLPs byla ověřena imunodetekcí (Obrázek 16). VLPs byly dále charakterizovány hemaglutinačním testem (Tabulka 5) a také



elektronovou mikroskopií (Obrázek 17). Ve II. i III. frakci VP1 VLPs byly obsaženy prázdné a plné VLPs. III. frakce obsahovala i proteiny složené do tubulárních útvarů.

Během této druhé izolace VP1 VLPs byly připraveny také vzorky používané jako kontrola k VP1 VLPs. Tyto kontrolní vzorky byly připraveny z buněk Sf9 konfluentně narostlých na pěti miskách o průměru 10 cm stejným způsobem, jakým probíhala druhá izolace VLPs. Po rozdělení v gradientu CsCl byly vyčleněny 2 kontrolní frakce (barevně zvýrazněno v tabulce 4) označené jako MII Sf9 a MIII Sf9. Získané frakce VP1 VLPs i kontroly byly analyzovány pomocí SDS-PAGE (Obrázek 18).



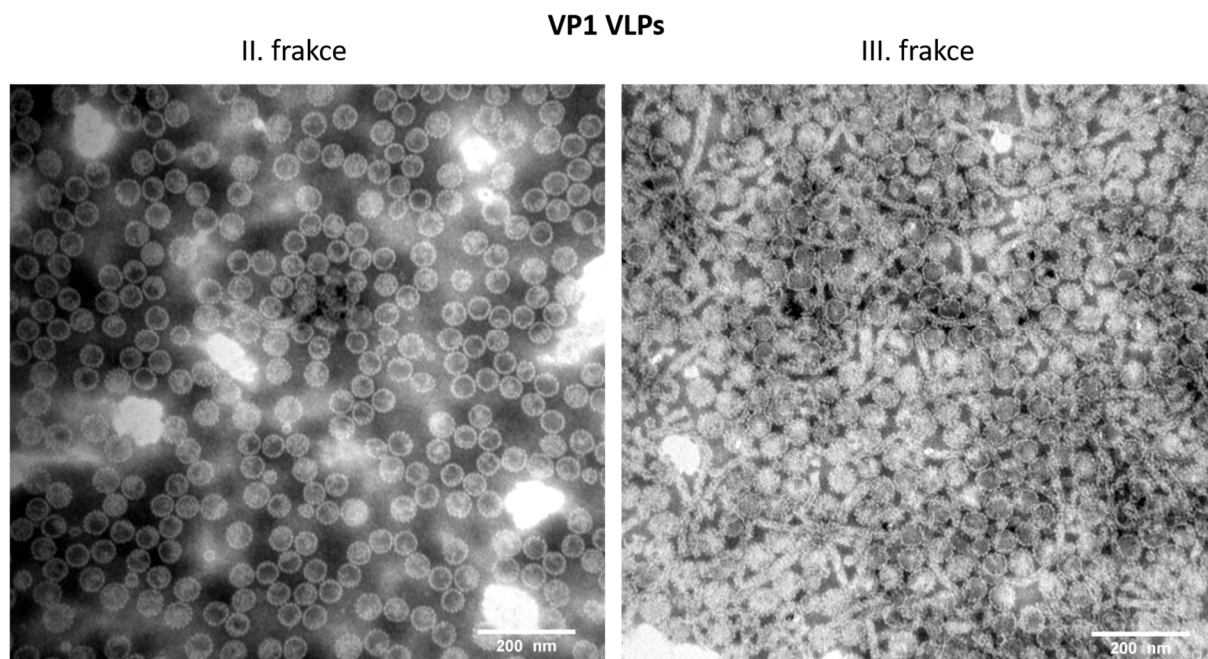
**Obrázek 16: Imunologická detekce proteinu VP1 v jednotlivých frakcích VP1 VLPs**

Přítomnost proteinu VP1 v získaných frakcích VP1 VLPs byla prokázána kombinací metod SDS-PAGE a Western blot s následnou imunodetekcí proteinu imobilizovaného na membráně. Ve frakcích kontroly (MII Sf9 a MIII Sf9) protein VP1 nebyl detekován.

Na SDS-PAGE bylo naneseno 10 ng frakcí VP1 VLPs. Kontrolní vzorky byly na SDS-PAGE přidány v maximálním možném objemu – v obou případech nanesený kontrolní vzorek obsahoval 1 µg proteinů. Protein VP1 byl označen pomocí primární protilátky MαVP1 a sekundární protilátky GαM-HRP.

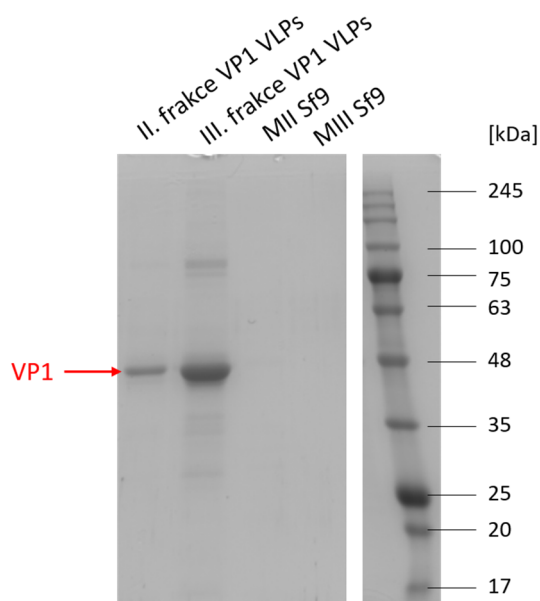
**Tabulka 5: Hemaglutinační titr VP1 VLPs – II. a III. frakce**

|                                  | VP1 VLPs II. frakce  | VP1 VLPs III. frakce |
|----------------------------------|----------------------|----------------------|
| Hemaglutinační titr [částice/ml] | $6,5 \times 10^{13}$ | $2,6 \times 10^{14}$ |



**Obrázek 17: Izolované VP1 VLPs**

Elektronová mikroskopie II. a III. frakce izolace VP1 VLPs. Negativní barvení.



**Obrázek 18: Analýza II. a III. frakce VP1 VLPs pomocí SDS-PAGE**

Frakce VP1 VLPs a kontrol (MII Sf9 a MIII Sf9) byly analyzovány pomocí SDS-PAGE. Na gel byl nanesen 1 µg získaných vzorků. Proteiny byly obarveny barvou GelCode™.

Šipkou je označen proužek odpovídající svou mobilitou strukturnímu proteinu VP1.

V posledním sloupci se nachází standard molekulové hmotnosti Black Protein Ladder.

### 5.3 Izolace VP1/3 VLPs z buněk 3T6

Zatímco k pomnožení MPyV jsou využívány myší buňky, při přípravě VLPs může být použita celá řada expresních systémů. Protože viru podobné částice mohou obsahovat části hostitelské DNA a s jejich povrchem mohou interagovat různé hostitelské proteiny, VLPs produkované v různých expresních systémech se od sebe v některých ohledech liší. Stejně tak tyto částice mohou vázat jiné buněčné složky než infekční viriony.

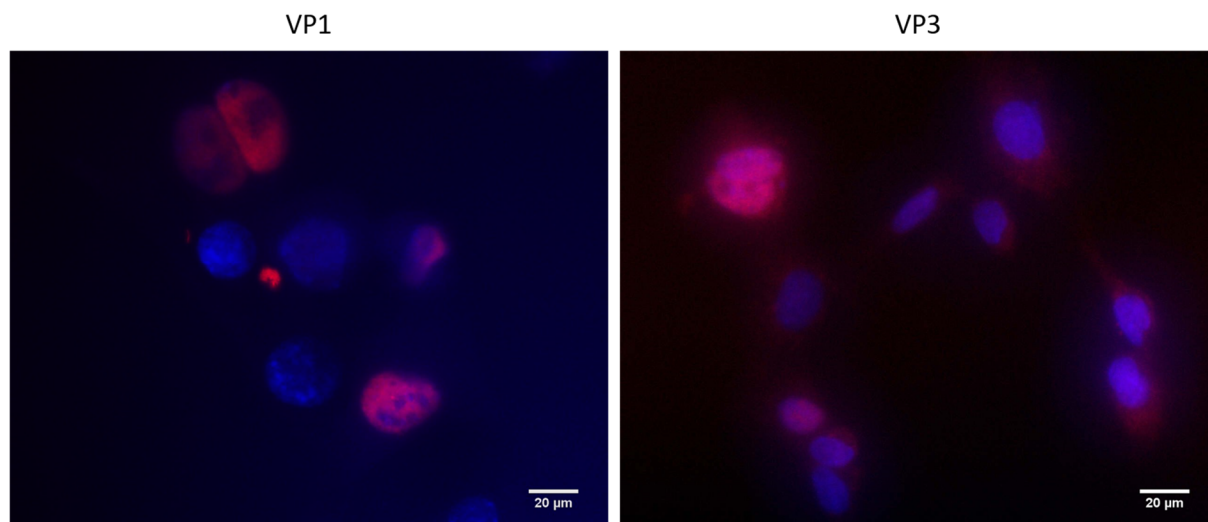
Savčí buňky ovšem při přípravě polymavirových VLPs zpravidla nejsou využívány. Hlavním důvodem je skutečnost, že ve srovnání s jinými dostupnými expresními systémy poskytují výrazně nižší výtěžky (Přehledně zpracováno v Teunissen *et al.*, 2013).

Při přípravě částic podobných MPyV v savčích buňkách je potřeba zohlednit také skutečnost, že samostatně produkovaný protein VP1 se v savčích buňkách nachází zejména v cytoplazmě (Horníková *et al.*, 2017). Pro skládání VLPs je ovšem nezbytný jeho transport do jádra. Ze savčích buněk tak lze VLPs izolovat, pokud je v buňkách kromě proteinu VP1 produkován také alespoň jeden ze dvou minoritních kapsidových proteinů, který zajistí jaderný import VP1 (Tolstov *et al.*, 2009).

Pro izolaci VLPs z myších fibroblastů jsme se proto rozhodli připravit částice tvořené proteinem VP1 a minoritním virovým proteinem VP3.

Buňky 3T6 byly kultivovány do chvíle, kdy jejich konfluence dosahovala přibližně 70 %. Poté byly do těchto buněk transfekcí (metodou nukleofekce) vpraveny vektory kódující virový protein VP1 (plazmid pwP) a VP3 (plazmid ph3p).

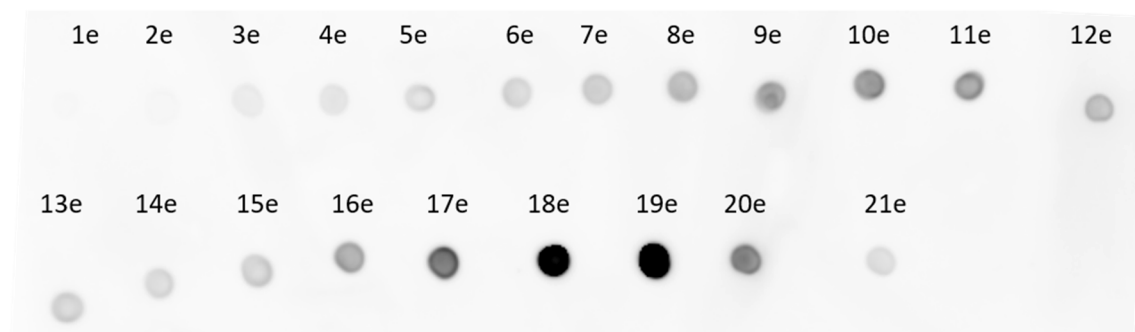
Pro ověření úspěšnosti transfekce byla do misek, na kterých byly buňky po transfekci kultivovány, předem vložena mikroskopická sklíčka, na kterých byla 24 hodin po transfekci provedena imunologická značení proteinů VP1 a VP3 (Obrázek 19). (Proteiny byly značeny samostatně – na různých sklíčkách.) Takto bylo ověřeno, že v buňkách skutečně dochází k tvorbě virových proteinů. Oba proteiny byly pozorovány zejména v jádrech buněk. Společná exprese proteinu VP1 a VP3 tedy zajistila účinný transport proteinu VP1 do jádra.



**Obrázek 19: Produkce proteinů VP1 a VP3 po transfekci buněk 3T6**

Buňky 3T6 byly fixovány 24 hodin po transfekci plazmidy pwP a ph3p. Jádru je obarveno modře pomocí DAPI. Vlevo je červeně značený protein VP1 myšího polyomaviru kombinací primární protilátky M $\alpha$ VP1-A5 a sekundární protilátky G $\alpha$ M-Cy3. Vpravo je červeně značen protein VP3 myšího polyomaviru kombinací primární protilátky M $\alpha$ VP2/3-1A2 a sekundární protilátky G $\alpha$ M-Cy3.

Tři dny po transfekci byly z buněk a média (z 5 misek o průměru 10 cm) izolovány VP1/3 VLPs. Částice byly izolovány stejným postupem jako MPyV, centrifugací přes 10% sacharózový polštář a následnou centrifugací v gradientu chloridu cesného. Gradient pak byl rozdělen do frakcí a přítomnost proteinu VP1 v jednotlivých frakcích byla ověřena metodou dot blot (Obrázek 20). Dále byl u frakcí změřen refraktometrický index (Tabulka 6). Na základě těchto testů byly vybrané frakce spojeny do frakce obohacené o plné částice (VP1/3 VLPs II. frakce) a frakce obohacené o prázdné částice (VP1/3 VLPs III. frakce). Spojení frakcí je barevně vyznačeno v tabulce 6. VLPs byly posléze zkoncentrovány centrifugací přes 10% sacharózový polštář.



**Obrázek 20: Ověření přítomnosti proteinu VP1 ve frakcích gradientu chloridu cesného**

Gradient (označen písmenem e) byl rozdělen do frakcí a přítomnost proteinu VP1 myšího polyomaviru ve frakcích byla ověřena metodou dot blot. Jednotlivé frakce byly očíslovány.

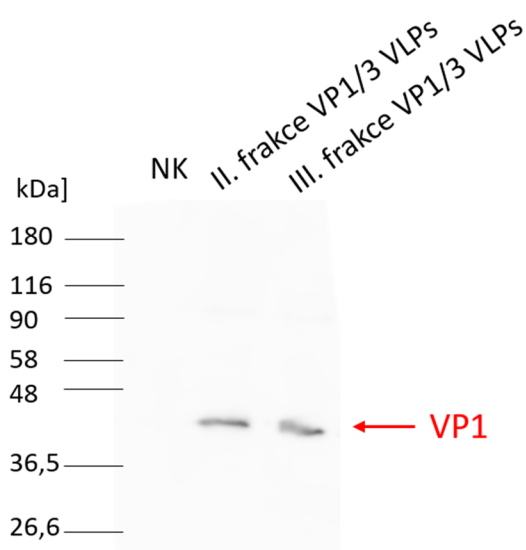
Byla použita primární protilátka proti proteinu VP1 M $\alpha$ VP1-A5 a sekundární protilátka G $\alpha$ M-HRP.

**Tabulka 6: Refraktometrické indexy frakcí gradientu CsCl**

U frakcí CsCl gradientu obsahujícího VP1/3 VLPs byly změřeny refraktometrické indexy. Červeně vyznačené frakce byly spojeny do frakce obohacené o plné částice označené jako „VP1/3 VLPs II. frakce“ a hnědě vyznačené frakce byly spojeny do frakce obohacené o prázdné částice označené jako „VP1/3 VLPs III. frakce“.

| Číslo frakce           | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     |
|------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Refraktometrický index | 1,370 | 1,371 | 1,371 | 1,369 | 1,368 | 1,367 | 1,366 | 1,366 |
| Číslo frakce           | 9     | 10    | 11    | 12    | 13    | 14    | 15    | 16    |
| Refraktometrický index | 1,365 | 1,366 | 1,365 | 1,365 | 1,364 | 1,364 | 1,364 | 1,363 |
| Číslo frakce           | 17    | 18    | 19    | 20    | 21    |       |       |       |
| Refraktometrický index | 1,363 | 1,362 | 1,362 | 1,361 | 1,360 |       |       |       |

Imunodetekcí byla v získaných suspenzích VP1/3 VLPs ověřena přítomnost virového proteinu VP1 (Obrázek 21).

**Obrázek 21: Imunologická detekce proteinu VP1 po izolaci VP1/3 VLPs**

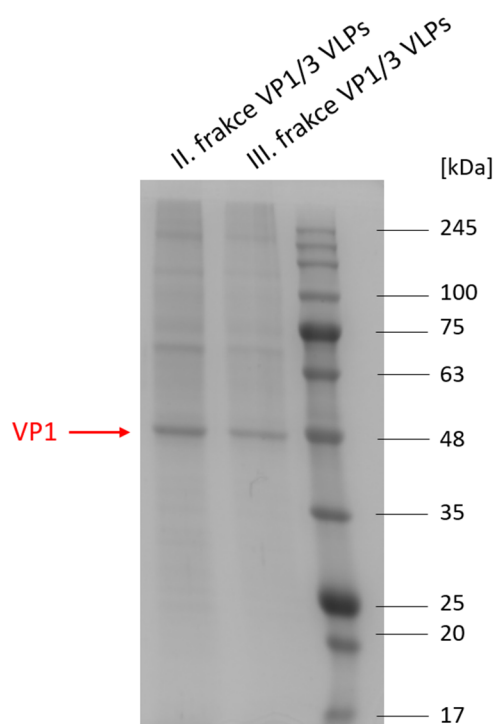
Přítomnost proteinu VP1 v získaných suspenzích VP1/3 VLPs byla prokázána kombinací metod SDS-PAGE a Western blot s následnou imunodetekcí proteinu imobilizovaného na membráně. Jako negativní kontrola (NK) byl použit lyzát buněk 3T6.

Na SDS-PAGE bylo naneseno 10 µg buněčného lyzátu a 10 ng II. a III. frakce VP1/VP3 VLPs. Protein VP1 byl označen primární protilátkou M $\alpha$ VP1 a sekundární protilátkou G $\alpha$ M-HRP.

VLPs byly dále charakterizovány hemaglutinačním testem (Tabulka 7) a SDS-PAGE (Obrázek 22). Přítomnost částic ve vzorku byla prokázána také pomocí elektronové mikroskopie (Obrázek 23). Ve II. i III. frakci byly obsaženy prázdné i plné VP1/3 VLPs. V obou frakcích byla pozorována i přítomnost proteinů nesložených do částic a také tubulární částice.

**Tabulka 7: Hemaglutinační titr VP1/3 VLPs**

|                                  | VP1/3 VLPs II. frakce | VP1/3 VLPs III. frakce |
|----------------------------------|-----------------------|------------------------|
| Hemaglutinační titr [částice/ml] | $8,2 \times 10^{11}$  | $2 \times 10^{11}$     |

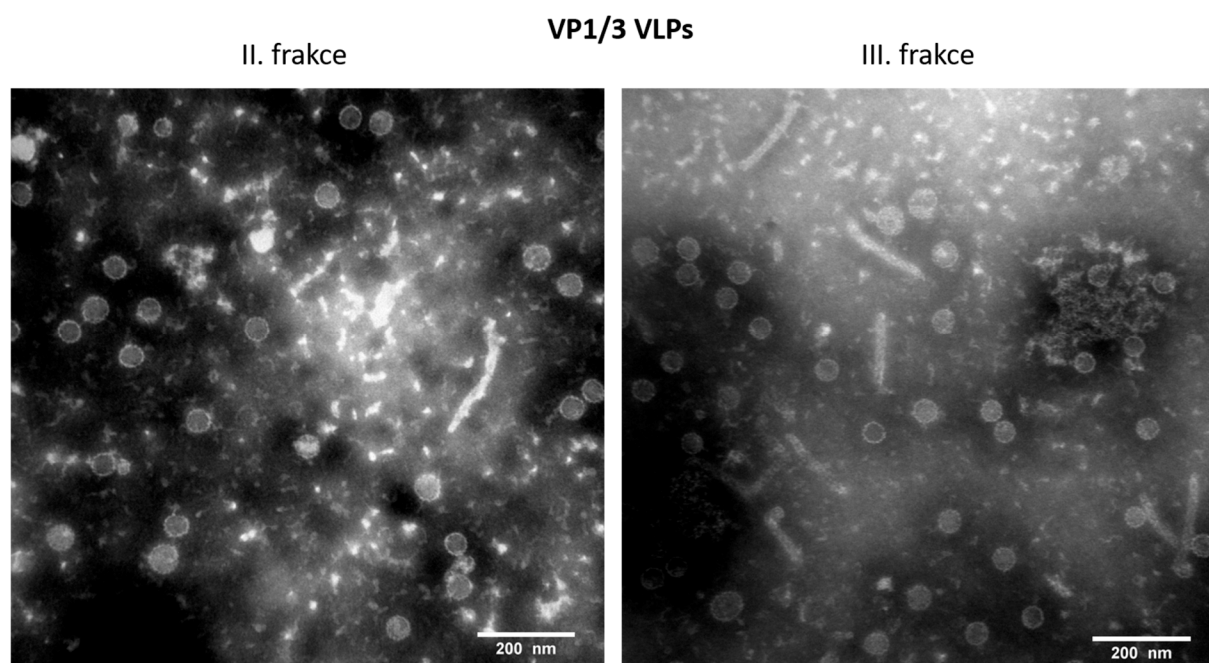


**Obrázek 22: Analýza VP1/3 VLPs na SDS-PAGE**

Na SDS-PAGE byl nanesen 1  $\mu$ g vzorků. Proteiny byly obarveny GelCode™.

Vyznačen je proužek odpovídající proteinu VP1.

V posledním sloupci se nachází standard molekulové hmotnosti Black Protein Ladder.



**Obrázek 23: Elektronová mikroskopie izolovaných VP1/3 VLPs**

Preparace VP1/3 VLPs byly analyzovány elektronovou mikroskopií metodou negativního barvení.

## 5.4 Interakce MPyV s Toll-like receptory

Pro studium interakce myšího polyomaviru a Toll-like receptorů jsme zvolili buňky myších embryonálních fibroblastů. Myší polyomavirus je schopen buňky MEF infikovat a úspěšně v nich dokončit svůj replikační cyklus. Buňky MEF také účinně odpovídají na aktivaci TLRs a probíhá v nich signalizace z TLR4 i TLR9 (Kurt-Jones *et al.*, 2004).

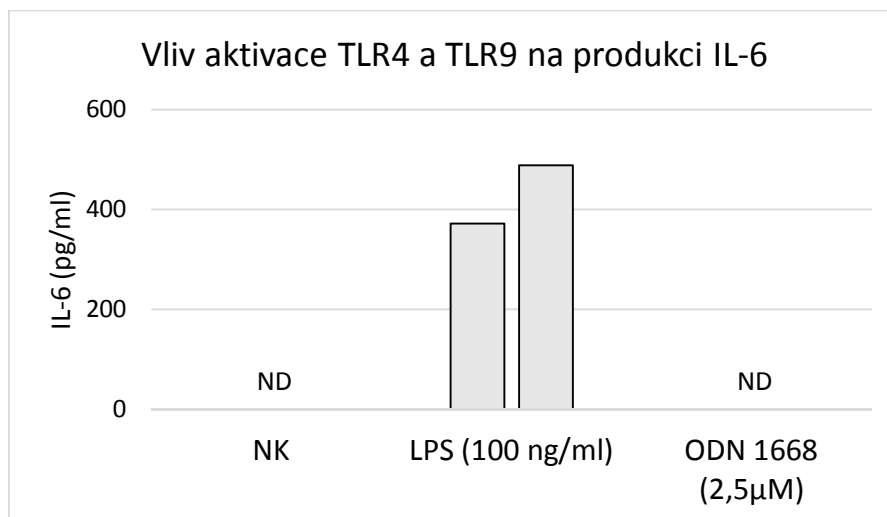
### 5.4.1 Ověření aktivace signalizace z TLR4 a TLR9 pomocí metody ELISA

Pro stanovení signalizace z TLRs jsme se rozhodli metodou ELISA měřit koncentraci IL-6. IL-6 je prozánětlivý cytokin, k jehož produkci dochází po aktivaci TLR signalizace (Shrnuto v Takeuchi & Akira, 2010).

Pro ověření, zda je možné tímto způsobem sledovat aktivaci signalizace z TLR4 a TLR9, byla nejprve testována odpověď buněk MEF na aktivátory signalizace z těchto receptorů. Pro aktivaci signalizace z TLR4 byl zvolen lipopolysacharid z *E-coli* a pro aktivaci TLR9 byl použit aktivátor ODN 1668. ODN 1668 označuje syntetické oligodeoxynukleotidy, které obsahují fosforothiotátovou kostru a sekvenční CpG motiv stimulující signalizaci z TLR9 (Heit *et al.*, 2004; shrnuto v Krieg, 1999).

Synchronizované buňky MEF byly kultivovány na 96 jamkové desce v médiu s 0,5% sérem s přidaným LPS ( $c=100$  ng/ml) nebo s ODN 1668 ( $2,5\mu\text{M}$ ). Po 24 hodinách bylo odebráno médium z buněk a byla stanovena koncentrace cytokinu IL-6 v médiu (Obrázek 24). V médiu odebraném z buněk, které byly stimulovány pomocí LPS, byla zjištěna přítomnost IL-6. Oproti tomu ve vzorcích, které byly kultivovány pouze v médiu s 0,5% sérem (negativní kontrola) nebo stimulovány ODN 1668, nepřekročila koncentrace IL-6 hladinu detekce.





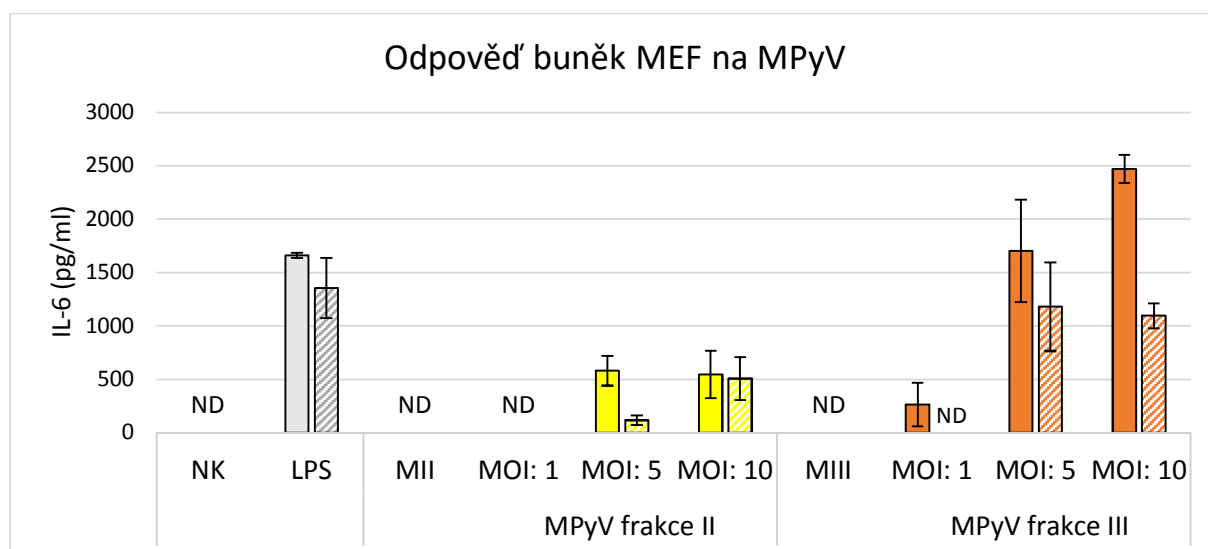
#### Obrázek 24: LPS stimuluje produkci IL-6 buňkami MEF

Synchronizované buňky MEF byly kultivovány v přítomnosti aktivátoru signalizace z TLR4 (LPS) nebo TLR9 (ODN 1668). Po 24 hodinách byla změřena koncentrace IL-6 v médiu metodou ELISA. Negativní kontrolu (NK) představují buňky kultivované pouze v médiu s 0,5% sérem. ND = odpověď nebyla detekována.

V grafu jsou vyneseny hodnoty získané z biologických duplikátů. Prezentovaná data představují jeden ze dvou nezávislých experimentů. I ve druhém provedeném experimentu byla detekována odpověď pouze po stimulaci LPS.

#### 5.4.2 Odpověď buněk MEF na myší polyomavirus

Následně jsme zjišťovali, zda buňky MEF odpovídají také na MPyV. Synchronizované buňky MEF na 96 jamkové desce byly infikovány MPyV (MOI: 1; 5 a 10) a 24 hodin po infekci byla metodou ELISA zjištěna koncentrace IL-6 v médiu odebraném z buněk (Obrázek 25). Jako „kontrola MOCK“ k infekci MPyV byly buňky stimulovány preparacemi MII nebo MIII, které byly přidány do média s 0,5% sérem ve stejném objemu, jako virové inokulum k buňkám infikovaným multiplicitou infekce 10. Při analýze získaných výsledků (Obrázek 25), byl pozorován trend, kdy buňky MEF odpovídají na MPyV produkcí IL-6 a tato odpověď závisí na množství přidaného viru. U buněk stimulovaných MII nebo MIII nebyla metodou ELISA zjištěna produkce IL-6.



**Obrázek 25: Buňky MEF odpovídají na MPyV produkcí IL-6**

Synchronizované buňky MEF byly infikovány MPyV o různých multiplicitách infekce. 24 hodin po infekci byla změřena koncentrace IL-6 v médiu metodou ELISA. Negativní kontrolu (NK) představují synchronizované buňky MEF. Jako pozitivní kontrola byla měřena přítomnost IL-6 v médiu buněk stimulovaných LPS (100 ng/ml). Jako kontrola MOCK k infekci MPyV byly buňky stimulovány izolací MII nebo MIII.

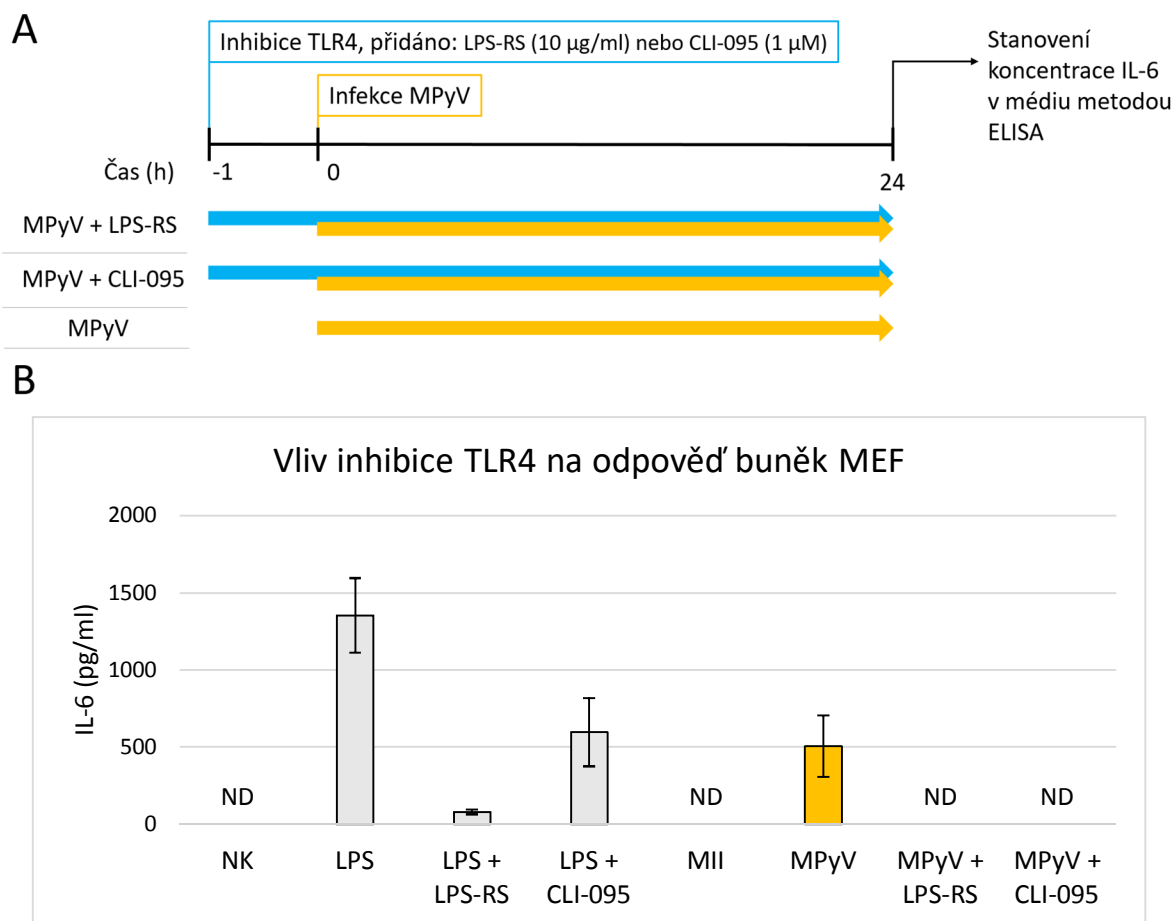
Data jsou prezentována jako průměrná hodnota z triplikátů  $\pm$  směrodatná odchylka. Dva nezávislé experimenty jsou od sebe odlišeny šrafováním.

V minulosti bylo popsáno, že produkce cytokinů buňkami myších makrofágů jako odpověď na MPyV je zprostředkována TLR4 (Velupillai *et al.*, 2012). Po zjištění, že buňky MEF odpovídají na infekci MPyV produkcí IL-6, jsme se rozhodli ověřit možnou roli TLR4 v této odpovědi. Proto jsme testovali, zda produkci IL-6 buňkami MEF po infekci MPyV ovlivní inhibice signalizace z TLR4. K inhibici TLR4 signalizace byly používány dva přístupy. Prvním byla inkubace buněk s antagonistou TLR4 LPS-RS. LPS-RS označuje lipopolysacharid izolovaný z bakterie *Rhodobacter sphaeroides*. Druhým používaným způsobem inhibice TLR4 signalizace byla inhibice pomocí CLI-095. Inhibitor CLI-095 je molekula selektivně inhibující intracelulární signalizaci vedoucí k produkci cytokinů po aktivaci TLR4 (Ii *et al.*, 2006).

Buňky MEF narostlé na 96 jamkové desce byly synchronizovány a následně inkubovány v médiu s 0,5% sérem případně v médiu s 0,5% sérem s přidaným LPS-RS (10  $\mu$ g/ml), nebo CLI-095 (1  $\mu$ M). Po 1 hodině byly buňky infikovány MPyV (MOI: 10) (Obrázek 26A). Z buněk bylo odebráno médium 24 hodin po infekci a koncentrace IL-6 byla zjištěna metodou ELISA (Obrázek 26B).

Po infekci buněk MEF MPyV byl v buněčném médiu detekován IL-6. Pokud ovšem infekce probíhala v přítomnosti inhibitoru nebo antagonisty TLR4, nepřekročila koncentrace IL-6 hladinu detekce.

Pro ověření účinku LPS-RS a CLI-095 byla testována jejich schopnost ovlivnit produkci IL-6 po stimulaci buněk MEF LPS. Po stimulaci buněk pomocí LPS v přítomnosti inhibitoru byl v médiu stále detekován IL-6, ale v nižší koncentraci než v kontrole bez inhibice (Obrázek 26B).



**Obrázek 26: Inhibice TLR4 ruší odpověď buněk MEF na MPyV**

**A:** Schéma experimentu inhibice TLR4 během infekce MPyV **B:** Synchronizované buňky MEF byly hodinu kultivovány v přítomnosti LPS-RS (10 µg/ml) nebo CLI-095 (1µM). Kontrolní buňky byly inkubovány pouze v médiu DMEM s 0,5% sérem. Poté byly buňky infikovány MPyV (II. frakce, MOI: 10) nebo stimulovány přidáním LPS do média (100 ng/ml). Koncentrace IL-6 v médiu byla zjištěna metodou ELISA 24 hodin po infekci. Negativní kontrolu (NK) představují synchronizované buňky MEF. Jako kontrola MOCK byly buňky stimulovány přidáním MII do média: přidán byl stejný objem frakce MII jako II. frakce MPyV k infikovaným buňkám.

Data jsou prezentována jako průměrná hodnota z triplicátů  $\pm$  směrodatná odchylka. Prezentovaná data představují jeden ze dvou nezávislých experimentů. V obou provedených experimentech vedlo použití CLI-095 nebo LPS-RS ke kompletní inhibici odpovědi buněk MEF na MPyV.

### 5.4.3 Vliv TLR4 na infekci MPyV

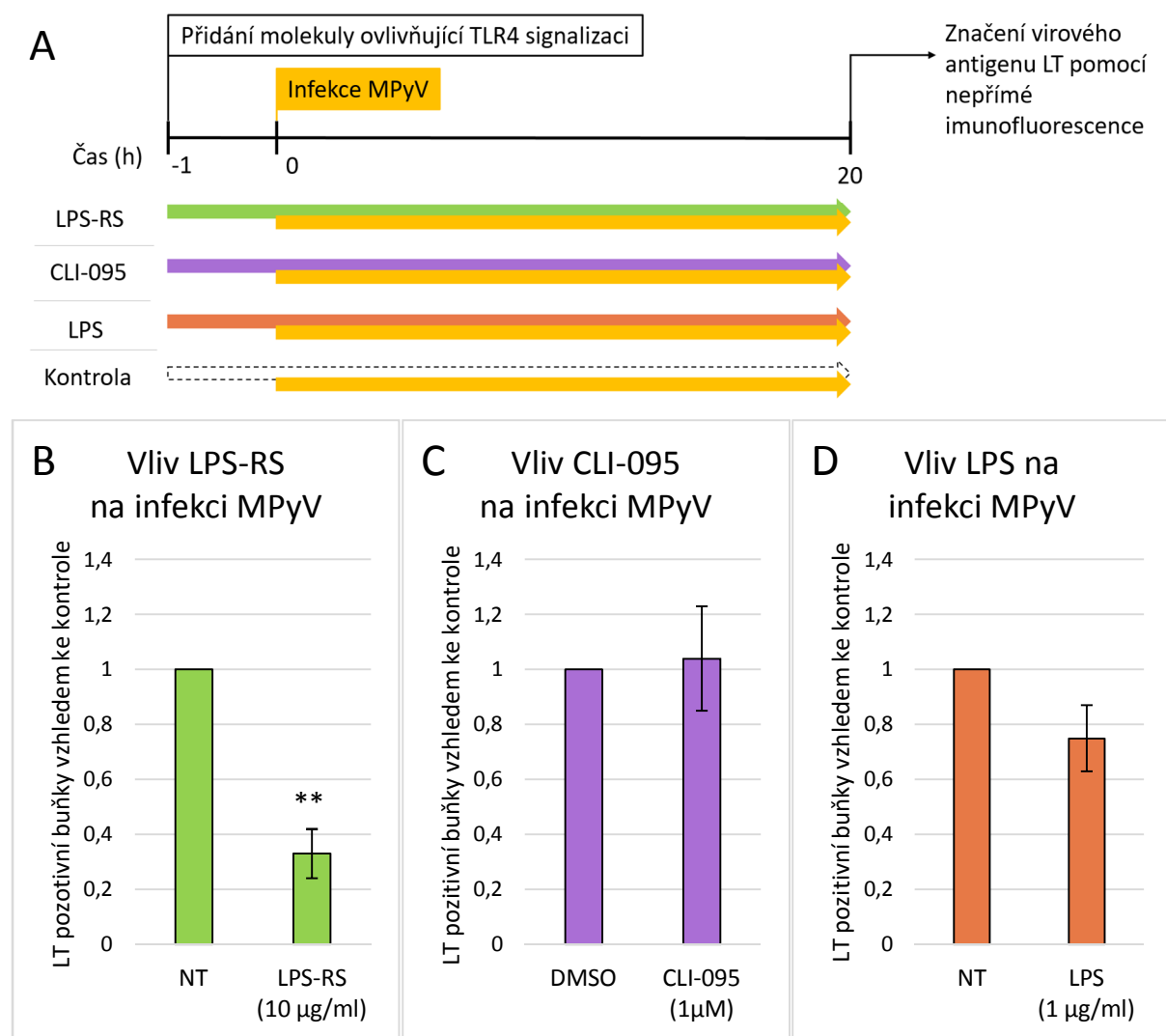
Skutečnost, že po inhibici signalizace z TLR4 nebyla nadále detekována odpověď na infekci MPyV, naznačila, že tento receptor hraje roli v odpovědi buněk MEF na MPyV. Dále jsme testovali dopad aktivace TLR4 na infekci MPyV.

Abychom zjistili, zda signalizace z TLR4 ovlivňuje virovou infekci, jsme se rozhodli otestovat, zda aktivace nebo inhibice signalizace z TLR4 ovlivní množství infikovaných buněk MEF 20 hodin po infekci. Proto byla provedena série experimentů, během kterých byl testován vliv LPS-RS, CLI-095 a LPS na virovou infekci. Počet infikovaných buněk byl stanoven značením časného virového antigenu LT pomocí nepřímé imunofluorescence.

Buňky MEF narostlé na mikroskopických sklíčkách v 24 jamkové desce do konfluence přibližně 40 %, byly synchronizovány. Následně byly 1 hodinu kultivovány v médiu s 0,5% sérem s přidáním LPS-RS (10 µg/ml) nebo CLI-095 (1µM) pro inhibici TLR4 signalizace, případně s LPS (1 µg/ml), který TLR4 stimuluje. Poté byly buňky infikovány MPyV (frakce II, MOI: 1). Ke vzorkům byly připraveny také kontrolní buňky, které byly před infekcí kultivovány pouze v médiu s 0,5% sérem. V případě přidání inhibitoru CLI-095, který byl rozpuštěn v DMSO, byly buňky kontroly inkubovány v médiu, do kterého bylo přidáno DMSO ve stejném objemu, jaký byl použit při práci s CLI-095. Po 20 hodinách byly buňky zafixovány a bylo provedeno nepřímé imunofluorescenční značení virového antigenu LT (Obrázek 27A).

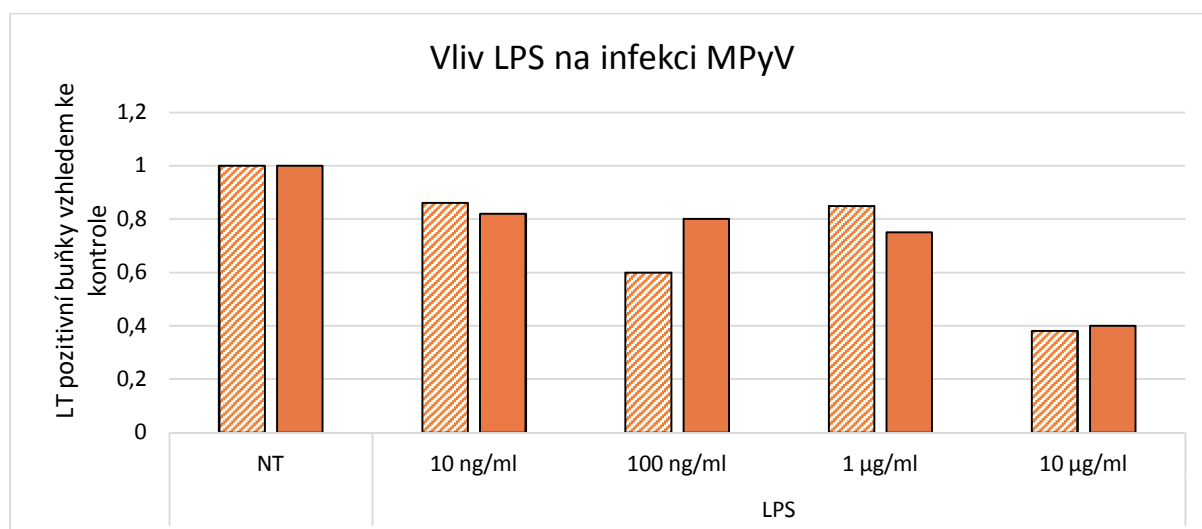
Bylo porovnáno množství LT pozitivních buněk na kontrolních a experimentálních sklíčkách. Použití antagonisty TLR4 LPS-RS vedlo ke statisticky signifikantnímu poklesu počtu infikovaných buněk (Obrázek 27B). Nicméně pokud byl použit druhý způsob inhibice TLR4 signalizace – inkubace s CLI-095 – nebyl ve množství LT pozitivních buněk zjištěn rozdíl (Obrázek 27C). Signifikantní rozdíl nebyl zjištěn ani při testování, jak infekci MPyV ovlivňuje LPS (Obrázek 27D). Přesto ale byl při infekci v přítomnosti LPS (1 µg/ml) ve třech provedených experimentech pozorován trend, kdy byl průměrný počet infikovaných buněk nižší než na kontrolních sklíčkách. Proto jsme se rozhodli otestovat efekt LPS i v jiných koncentracích. Experiment byl proveden stejně jako v předchozích případech. Testován byl efekt koncentrací LPS v rozmezí 10 ng/ml – 10 µg/ml (Obrázek 28). V případě použití koncentrace LPS 10 µg/ml počet infikovaných buněk MEF dále poklesl.

Množství infikovaných buněk tedy nebylo ovlivněno inhibitorem TLR4 signalizace CLI-095, ovšem došlo k poklesu počtu LT pozitivních buněk, pokud infekce probíhala v přítomnosti agonisty nebo antagonisty TLR4. Domníváme se, že LPS a LPS-RS by mohly ovlivnit infekci MPyV kompeticí o vazbu povrchové molekuly důležité pro infekci.



**Obrázek 27: Vliv signalizace z TLR4 na infekci MPyV**

**A:** Schéma experimentu. Synchronizované buňky MEF byly hodinu inkubovány v médiu DMEM s 0,5% sérem s přidaným LPS-RS (10 µg/ml), CLI-095 (1µM) nebo LPS (1 µg/ml). Poté byly infikovány MPyV (II. frakce, MOI: 1). Jako kontrola byly MPyV infikovány synchronizované buňky MEF (NT) nebo v (C) buňky, které byly hodinu před infekcí inkubovány v médiu s přidaným DMSO. Po 20 hodinách bylo provedeno nepřímé imunofluorescenční značení virového antigenu LT. **B, C, D:** Počet buněk infikovaných MPyV, vztaženo ke kontrole. Pro všechny vzorky byly spočítány buňky z dvaceti optických polí. Data jsou prezentována jako průměrná hodnota ze tří nezávislých experimentů ± směrodatná odchylka. Statistická signifikance byla stanovena nepárovým t-testem. Hodnota  $P < 0,01$  (\*\*) byla považována za signifikantní.



**Obrázek 28: Vliv LPS na infekci buněk MEF MPyV**

Počet LT pozitivních buněk vzhledem ke kontrole. Synchronizované buňky MEF byly hodinu inkubovány s LPS (10 ng/ml – 10 µg/ml) a pak byly infikovány MPyV (II. frakce, MOI:1). LPS bylo v médiu během celého trvání infekce. Jako kontrola (NT) byly MPyV infikovány synchronizované buňky MEF. 20 hodin po infekci bylo provedeno značení LT antigenu a pro všechny vzorky byly spočítány buňky z alespoň 15 optických polí. Dva nezávislé experimenty jsou odlišeny šrafováním.

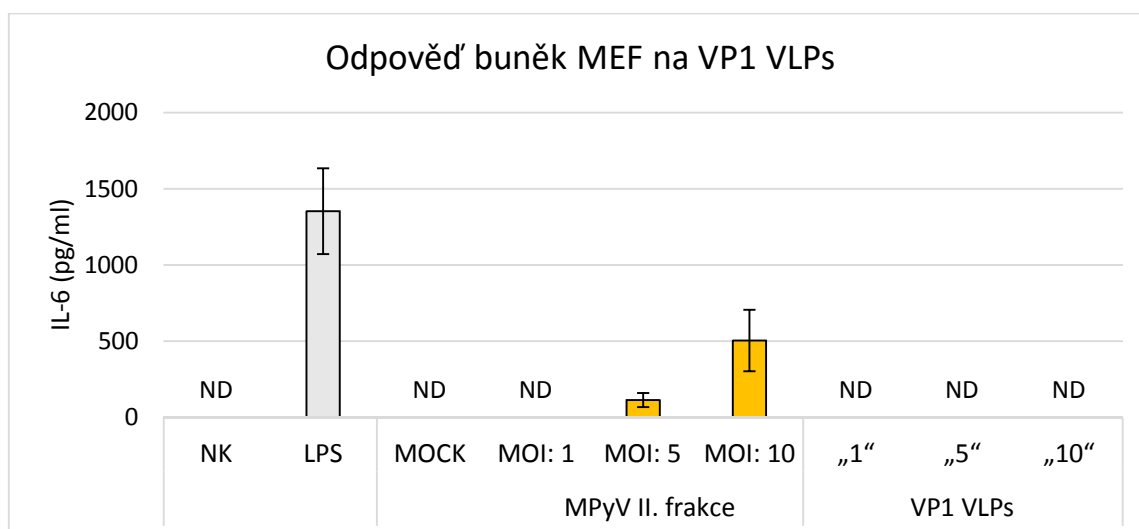
#### 5.4.4 Odpověď buněk MEF na VLPs

Během studia odpovědi myších splenocytů na MPyV bylo popsáno, že stimulace buněk pomocí VP1 VLPs indukuje stejnou cytokinovou odpověď jako MPyV (Velupillai *et al.*, 2006). Autoři uvedené studie pracovali s VP1 VLPs připravenými pomocí bakulovirového expresního systému a popsali, že pro aktivaci odpovědi je nezbytné, aby byl protein VP1 složen do kapsidových struktur. Pokud byly ke stimulaci použity pouze VP1 pentamery, odpověď nebyla pozorována.

Zajímalo nás, zda i buňky MEF odpovídají na VLPs stejným způsobem, jako na MPyV. Proto jsme metodou ELISA porovnávali, zda stimulace buněk MEF pomocí VP1 VLPs povede k produkci IL-6 obdobně jako infekce MEF myším polyomavirem.

Buňky MEF narostlé na 96 jamkové desce byly synchronizovány a infikovány MPyV (MOI: 1; 5 a 10). Paralelně byly připraveny vzorky, ve kterých byly buňky MEF stimulovány přidáním VP1 VLPs do média. Objem vzorku VP1 VLPs pro stimulaci byl zvolen tak, aby bylo na buňky přidáno stejné množství částic, jako při infekci MPyV (vzorky odpovídající multiplicitě infekce 1; 5 nebo 10 byly označeny „1“, „5“ a „10“). Množství částic ve vzorku bylo srovnáno na základě hemaglutinačního titru MPyV a VP1 VLPs. Koncentrace IL-6 v médiu odebraném z buněk byla zjištěna 24 hodin po infekci (a stimulaci pomocí VLPs) (Obrázek 29).

Zatímco v případě infekce MEF MPyV byl při multiplicitě infekce 5 a 10 v médiu detekován IL-6, ve vzorcích stimulovaných VP1 VLPs nebyl naměřen IL-6.



**Obrázek 29: Buňky MEF neodpovídají na VP1 VLPs**

Metodou ELISA byla změřena koncentrace IL-6 v médiu 24 hodin po infekci (nebo stimulaci VP1 VLPs) synchronizovaných buněk MEF. Ke stimulaci MEF prostřednictvím VP1 VLPs, bylo použito množství částic odpovídající počtu částic viru použitému při infekci multiplivitou 1; 5 a 10 (vzorky stimulované VP1 VLPs byly označeny „1“, „5“ a „10“). Negativní kontrolu (NK) představují buňky inkubované v médiu s 0,5% sérem a jako pozitivní kontrola byla měřena koncentrace IL-6 v médiu buněk stimulovaných LPS (100 ng/ml). Jako kontrola MOCK k virové infekci byly buňky stimulovány frakcí MII.

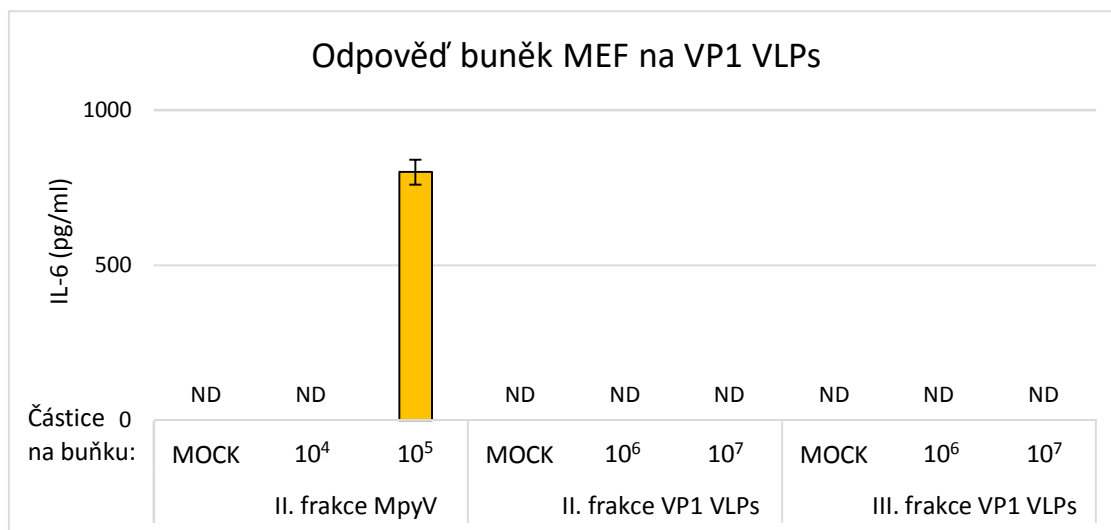
Data jsou prezentována jako průměrná hodnota z triplicátů  $\pm$  směrodatná odchylka. Prezentovaná data představují jeden ze dvou nezávislých experimentů. Ve druhém opakování rovněž nebyla detekována odpověď MEF na VP1 VLPs.

Při hledání příčiny tohoto rozdílu jsme se zaměřili na několik možností. První z nich byla, že pro vyvolání odpovědi buněk MEF pomocí VP1 VLPs je potřeba větší množství částic než v případě MPyV. Protože v používané suspenzi VP1 VLPs koncentrace VLPs neumožňovala otestovat efekt většího počtu částic než v předchozím experimentu ( $\sim 10^5$  částic na buňku), byly připraveny 2 koncentrovanější frakce VP1 VLPs (kapitola 5.2).

Na 96 jamkovou desku byly nasazeny buňky MEF (10 000 buněk na jamku) a následující den byly buňky synchronizovány. Poté byly buňky stimulovány přidáním VP1 VLPs (II. nebo III. frakce) do média. Byl testován efekt  $10^6$  a  $10^7$  částic na buňku. Jako „kontrola MOCK“ ke stimulaci byla do média přidána frakce MII Sf9 nebo MIII Sf9 o stejném objemu, jaký byl použit pro stimulaci buněk II. nebo III. frakcí koncentrovanější preparace VP1 VLPs. Jako kontrola bylo sledováno, jak produkci IL-6 ovlivní infekce MPyV. Koncentrace IL-6 v médiu byla stanovena 24 hodin po infekci a stimulaci buněk MEF (Obrázek 30).

Infekce MPyV vedla k produkci detekovatelného množství IL-6 při použití  $10^5$  částic na buňku. Množství  $10^4$  částic na buňku odpovídá přibližně MOI: 1 a  $10^5$  částic na buňku přibližně MOI: 10 z obrázku 29. Výsledky jsou tak v souladu s předchozími pozorováními. Oproti tomu

v případě stimulace buněk MEF pomocí VP1 VLPs se nepodařilo detekovat IL-6 v médiu ani při stimulaci buněk pomocí  $10^7$  částic na buňku. Ani s použitím koncentrovanější suspenze VP1 VLPs tak nebyla zjištěna odpověď buněk MEF na VP1 VLPs.



**Obrázek 30: Buňky MEF neodpovídají na VP1 VLPs**

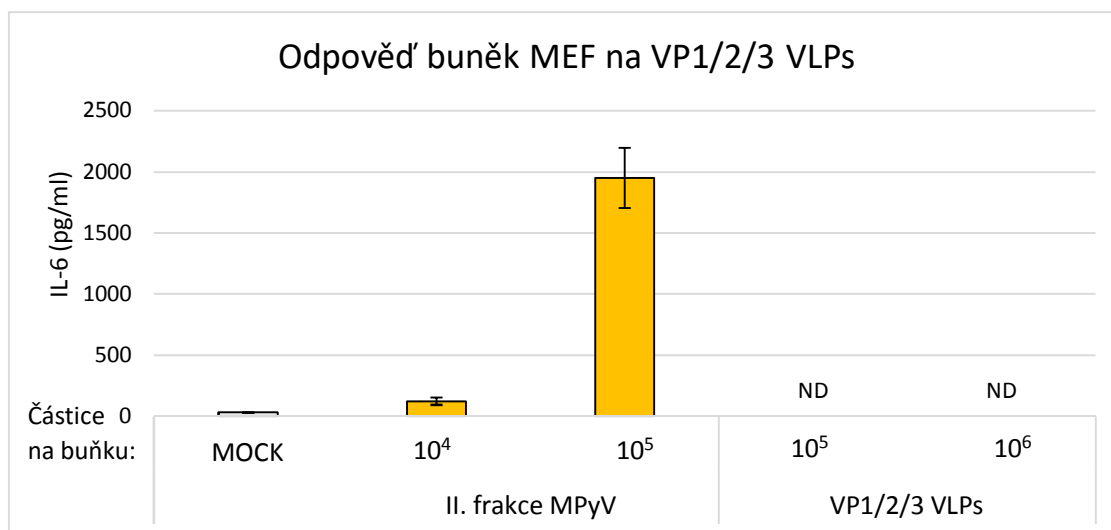
Metodou ELISA byla změřena koncentrace IL-6 v médiu 24 hodin po stimulaci synchronizovaných buněk MEF pomocí MPyV (II. frakce;  $10^4$  a  $10^5$  částic na buňku) nebo VP1 VLPs (II. a III. frakce;  $10^6$  a  $10^7$  částic na buňku). K jednotlivým vzorkům byly připraveny také kontroly MOCK: Synchronizované buňky MEF byly stimulovány pomocí izolace MII (pro MPyV), MII Sf9 (pro II. frakci VP1 VLPs) nebo MIII Sf9 (pro III. frakci VP1 VLPs). Pro kontrolu MOCK byl použit vždy objem odpovídající nejvyššímu použitému objemu při stimulaci pomocí izolátu, ke kterému byla kontrola připravena. Data jsou prezentována jako průměrná hodnota z triplikátů  $\pm$  směrodatná odchylka. Prezentovaná data představují jeden ze dvou nezávislých experimentů. Odpověď na VP1 VLPs nebyla zjištěna ani ve druhém experimentu.

Protože viriony MPyV obsahují na rozdíl od VP1 VLPs také minoritní kapsidové proteiny, nás zajímalo, zda může přítomnost VP2 a VP3 ovlivnit odpověď buněk MEF. Proto jsme měřili produkci IL-6 buňkami MEF po stimulaci pomocí VLPs tvořenými všemi kapsidovými proteiny MPyV (VP1/2/3 VLPs). VP1/2/3 VLPs nám byly poskytnuty S. Huérfano. Tyto VLPs byly připraveny pomocí bakulovirového expresního systému v buňkách Sf9. Tato metoda produkce VP1/2/3 VLPs umožňuje izolaci částic, ve kterých jsou jednotlivé virové proteiny zastoupeny ve srovnatelném poměru jako ve virionech MPyV (Forstová *et al.*, 1993).

Synchronizované buňky MEF narostlé na 96 jamkové desce byly stimulovány přidáním VP1/2/3 VLPs do média. Byla testována stimulace s použitím  $10^5$  a  $10^6$  částic na buňku. Kontrolní buňky byly stimulovány pomocí MPyV ( $10^4$  nebo  $10^5$  částic na buňku). 24 hodin po stimulaci bylo odebráno médium z buněk a koncentrace IL-6 v médiu byla stanovena metodou ELISA (Obrázek 31). Koncentrace IL-6 v médiu buněk stimulovaných pomocí VP1/2/3 VLPs



v žádném experimentu nepřekročila detekční hladinu. Nepodařilo se nám tedy zjistit, že by stimulace pomocí VP1/2/3 VLPs vedla u buněk MEF k produkci IL-6.



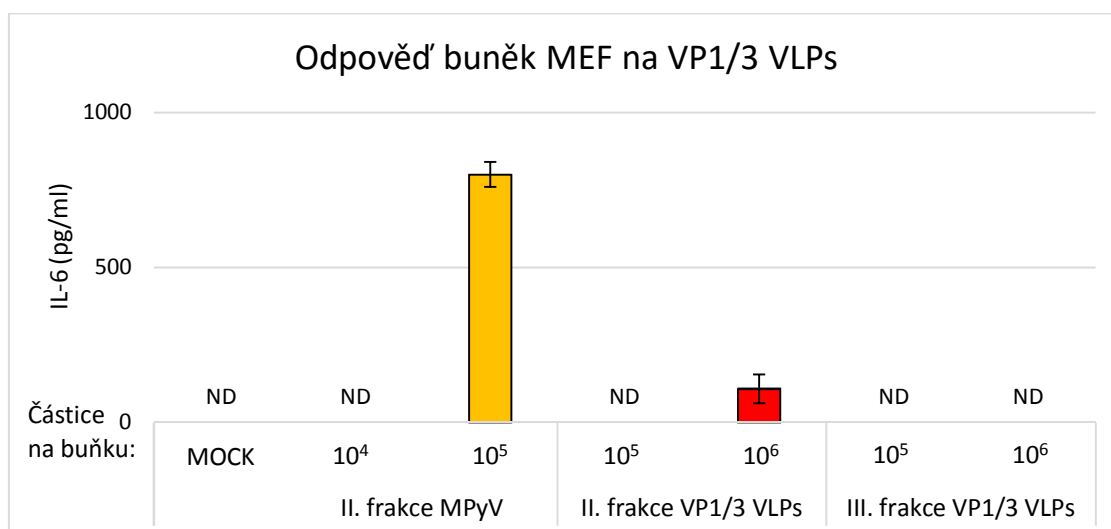
**Obrázek 31: Buňky MEF neodpovídají na VP1/2/3 VLPs**

Synchronizované buňky MEF byly stimulovány MPyV (II. frakce; 10<sup>4</sup> a 10<sup>5</sup> částic na buňku) nebo VP1/2/3 VLPs (10<sup>5</sup> a 10<sup>6</sup> částic na buňku). Jako kontrola MOCK k infekci MPyV byly buňky MEF stimulovány frakcí MII. Koncentrace IL-6 v médiu odebraném 24 hodin po stimulaci byla změřena metodou ELISA.

Data jsou prezentována jako průměrná hodnota z triplicátů ± směrodatná odchylka. Prezentovaná data představují jeden ze dvou nezávislých experimentů. Stimulace buněk MEF pomocí VP1/2/3 VLPs nevedla k produkci IL-6 ani v jednom z provedených experimentů.

Další možný důvod, proč VLPs neindukují v buňkách MEF stejnou odpověď jako MPyV, by mohl být, že odpověď na MPyV není zprostředkována přímo virovými proteiny, ale některým s interakčních partnerů virové kapsidy. Jak je uvedeno v kapitole 2.1.3, VLPs mohou v buňce zabít hostitelskou DNA s proteiny a další proteiny se mohou vázat na povrch kapsidy virionu i VLPs. Lze tak předpokládat, že námi připravené izolace MPyV a VLPs se od sebe v těchto ohledech liší. Proto jsme připravili také VP1/3 VLPs izolované z buněk 3T6 – tedy stejného typu buněk, jaký byl použit k pomnožení MPyV (kapitola 5.3).

Metodou ELISA byla zjištěna koncentrace IL-6 v médiu odebraném z buněk MEF 24 hodin po stimulaci MPyV (10<sup>4</sup> nebo 10<sup>5</sup> částic na buňku) nebo VP1/3 VLPs (II. a III. frakce, 10<sup>5</sup> nebo 10<sup>6</sup> částic na buňku) (Obrázek 32). Předběžné výsledky z jednoho experimentu ukazují, že k produkci IL-6 buňkami MEF došlo nejen po infekci MPyV, ale i po stimulaci buněk II. frakcí VP1/3 VLPs 10<sup>6</sup> částic na buňku. Protože izolace VLPs ze savčích buněk poskytuje pouze nízké výtěžky, bude pro budoucí potvrzení těchto výsledků nezbytné izolaci zopakovat.



**Obrázek 32: Odpověď buněk MEF na VP1/3 VLPs**

Koncentrace IL-6 v médiu 24 hodin po stimulaci buněk MPyV a VP1/3 VLPs.

Synchronizované buňky MEF byly stimulovány MPyV (II. frakce; 10<sup>4</sup> a 10<sup>5</sup> částic na buňku) nebo VP1/3 VLPs (II. a III. frakce; 10<sup>5</sup> a 10<sup>6</sup> částic na buňku). Jako kontrola MOCK k infekci MPyV byly buňky MEF stimulovány izolací MII. Data jsou prezentována jako průměrná hodnota z triplikátů ± směrodatná odchylka.

#### 5.4.5 Stanovení aktivace signalizace z TLR9 metodou kvantitativní PCR

Protože metodou ELISA se nám nepodařilo u buněk MEF sledovat spuštění signalizace z TLR9 (kapitola 5.4.1), rozhodli jsme se vyzkoušet pro stanovení aktivace TLR9 jiný přístup. Testovali jsme, zda se nám podaří dosáhnout citlivější detekce pomocí kvantitativní PCR. Pro sledování aktivace signalizace z TLR9 jsme ve vzorcích porovnávali množství mRNA genu pro IL-6.

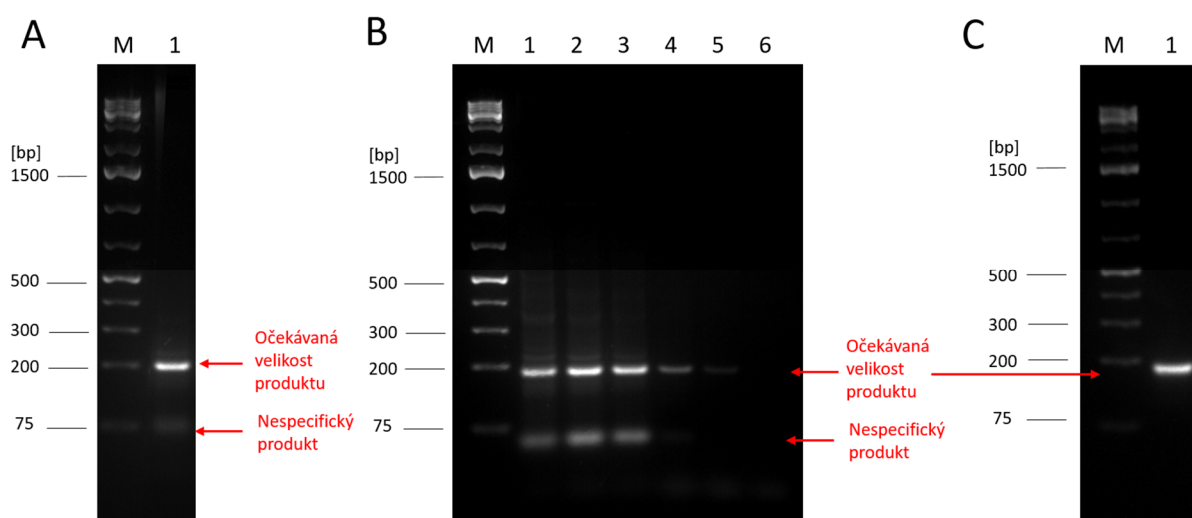
##### 5.4.5.1 Příprava a ověření primerů proti IL-6

Primery nasedající na mRNA genu pro IL-6 byly navrženy tak, aby pokrývaly všechny čtyři sestřihové varianty genu a tak, aby byl jeden z primerů komplementární k sekvenci dvou různých exonů a přesahoval část sekvence přerušenou intronem. Takto byl primer zvolen proto, aby se zabránilo vazbě primeru na genomovou DNA. Sekvence mRNA IL-6 byla získána z prohlížeče Ensembl ([http://www.ensembl.org/Mus\\_musculus/Gene/Splice?db=core;g=E NSMUSG000000025746;r=5:30013114-30019981](http://www.ensembl.org/Mus_musculus/Gene/Splice?db=core;g=E NSMUSG000000025746;r=5:30013114-30019981), staženo 20. 7. 2016).

Pro ověření specifity primerů byla připravena kontrolní cDNA z buněk MEF. Buňky byly stimulovány pomocí LPS (100 ng/ml). Po čtyřech hodinách stimulace byla z buněk izolována RNA, která byla následně přepsána do cDNA. Prvním krokem ověření specifity primerů bylo jejich otestování pomocí klasické PCR. Jako teplota nasedání primerů byla pro tuto reakci zvolena teplota denaturace primerů vypočítaná výrobcem primerů: 56 °C. Při těchto podmínkách PCR reakce ovšem docházelo kromě syntézy produktu o odpovídající délce také

k tvorbě kratšího, nespecifického produktu (Obrázek 33A). Gradientová PCR následně ukázala, že tvorbě nespecifického produktu lze zabránit zvýšením teploty nasedání primerů (Obrázek 33B).

Následně byly primery ověřeny i pomocí kvantitativní PCR. Na základě výsledku gradientové PCR byla k otestování kvantitativní PCR zvolena nasedání primerů 60 °C. Za těchto podmínek kvantitativní PCR reakce proběhla úspěšně. Křivka tání primerů ukázala, že v reakci došlo ke vzniku pouze jediného produktu (neukázáno) a pomocí elektroforetického rozdělení na agarózovém gelu bylo ověřeno, že tento produkt má očekávanou velikost (Obrázek 33C).



**Obrázek 33: Optimalizace teploty nasedání primerů na mRNA pro IL-6**

**A, B:** Elektroforetogram produktů PCR reakce po amplifikaci cDNA izolované z buněk MEF po 4 hodinách stimulace LPS (100 ng/ml). Byly použity primery nasedající na cDNA genu pro IL-6. Teplota nasedání primerů v reakci byla v **(A)** 56 °C, v **(B)** bylo testováno rozpětí teplot. Testované teploty (značeno čísla 1 – 6) byly následující: 56,5 °C; 57,5 °C; 59 °C; 60 °C; 62 °C a 64 °C.

Očekávaná velikost produktu je 187 párů bází. Ve sloupci označeném M se nachází standard molekulové hmotnosti. **C:** Elektroforetogram produktu kvantitativní PCR reakce. Primery a cDNA byly použity jako v **(A, B)**. Teplota nasedání primerů v reakci byla 60 °C. Ve sloupci označeném M se nachází standard molekulové hmotnosti.

### 5.3.5.2 Stanovení signalizace z TLR9 v buňkách MEF

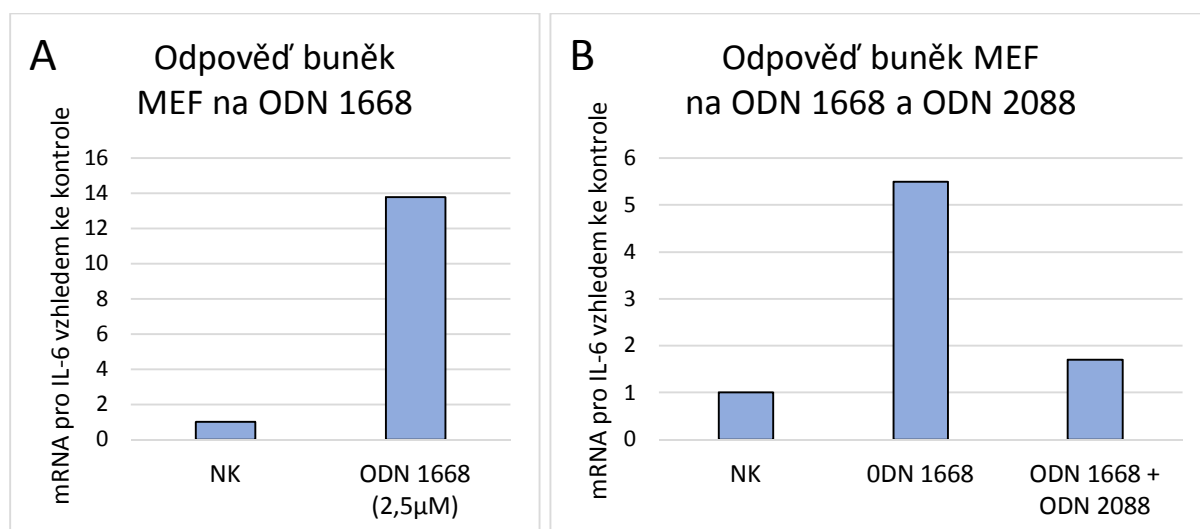
Abychom ověřili, zda je možné pomocí kvantitativní PCR sledovat aktivaci signalizace z TLR9, jsme testovali, zda inkubace buněk MEF s agonistou TLR9 ODN 1668 ovlivní množství mRNA pro IL-6.

Synchronizované buňky MEF byly stimulovány přidáním ODN 1668 (2,5 $\mu$ M) do média. Jako pozitivní kontrola byly použity buňky stimulované LPS (100 ng/ml) a jako negativní kontrola buňky kultivované v médiu DMEM s 0,5% sérem. Po 5 hodinách stimulace byla izolována RNA z buněk. RNA poté byla přepsána do cDNA a kvantitativní PCR bylo zjištěno množství mRNA pro IL-6 v jednotlivých vzorcích. Ve vzorku stimulovaném LPS bylo více než 1000x více IL-6 mRNA než v kontrolním vzorku. Zvýšené množství mRNA (13,8x) bylo detekováno i ve vzorku získaném po stimulaci buněk ODN1668 (Obrázek 34A).

Pro inhibici signalizace z TLR9 jsme využívali antagonistu TLR9 – ODN 2088. ODN 2088 označuje oligonukleotidy s fosforothiotátovou kostrou, schopné neutralizovat odpověď indukovanou oligodeoxynukleotidy s imunostimulačním CpG motivem (Stunz *et al.*, 2002). Pro kontrolu účinnosti ODN 2088 jsme testovali jejich schopnost inhibovat ODN 1668.

Synchronizované buňky MEF byly kultivovány v médiu DMEM s 0,5% sérem s přidáními ODN 2088 (10 $\mu$ M). Po 1 hodině byly do média přidány ODN 1668 (2,5 $\mu$ M). Kontrolní vzorky byly pouze stimulovány ODN 1668 (2,5 $\mu$ M). Vzorky negativní kontroly byly kultivovány bez přidání antagonisty nebo agonisty TLR9. Izolace RNA z buněk proběhla 5 hodin po přidání ODN 1668. Poté byla RNA přepsána do cDNA a bylo porovnáno množství mRNA pro IL-6 ve vzorku. Stimulace signalizace z TLR9 vedla ve srovnání s negativní kontrolou k produkci většího množství mRNA. Tento efekt byl částečně inhibován ODN 2088. (Obrázek 34B)

Na rozdíl od metody ELISA tak kvantitativní PCR poskytla dostatečně citlivou detekci, aby bylo možné sledovat signalizaci buněk MEF z TLR9.



**Obrázek 34: Odpověď buněk MEF na ODN 1668 a ODN 2088**

**A:** Synchronizované buňky MEF byly 5 hodin stimulovány ODN 1668 (2,5μM). Buňky negativní kontroly byly kultivovány v médiu DMEM s 0,5% sérem. Z buněk byla izolována RNA a přepsána do cDNA. Kvantitativní PCR bylo stanoveno množství mRNA pro IL-6 ve vzorku vzhledem ke kontrole. Výsledky byly normalizovány k referenčnímu genu HGPRT. V grafu není znázorněna stimulace buněk pomocí LPS (100 ng/ml), která vedla k zvýšení množství mRNA pro IL-6 více než 1000x.

**B:** Synchronizované buňky MEF byly hodinu kultivovány v médiu s 0,5% sérem nebo v médiu s 0,5% sérem s přidanými ODN 2088 (10μM). Poté byly do média přidány ODN 1668 (2,5μM). Po 5 hodinách inkubace s ODN 1668 byla izolována RNA z buněk a přepsána do cDNA. Kvantitativní PCR bylo zjištěno množství mRNA pro IL-6 ve vzorcích vzhledem k negativní kontrole – cDNA získané ze synchronizovaných buněk MEF. Výsledky byly normalizovány k referenčnímu genu HGPRT.

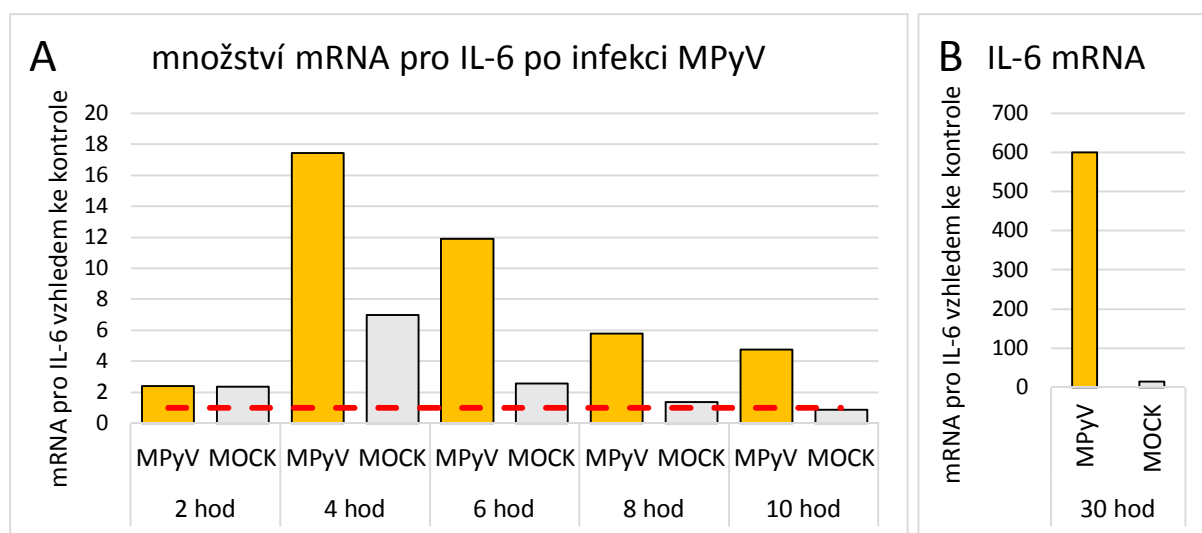
#### 5.4.6 Detekce odpovědi buněk MEF na MPyV pomocí qPCR

Abychom zjistili, zda se na detekci MPyV buňkami MEF kromě TLR4 může podílet i TLR9, jsme se rozhodli otestovat, zda ODN 2088 ovlivní odpověď buněk MEF na MPyV. Sledovali jsme rozdíl v množství mRNA pro IL-6 ve vzorku.

Nejdříve jsme zjišťovali, v jakých časech po infekci dochází k ovlivnění přepisu genu pro IL-6. Synchronizované buňky MEF narostlé na 6 jamkové desce byly infikovány MPyV (II. frakce, MOI: 1). Z buněk byla izolována RNA v různých časech časné fáze virové infekce (2 – 10 hod) nebo v jednom časovém bodě v pozdní fázi infekce (30 hod). Jako negativní kontrola byla izolována RNA ze synchronizovaných buněk MEF. RNA byla přepsána do cDNA a množství mRNA pro IL-6 bylo stanoveno kvantitativní PCR reakcí (Obrázek 35A, B). Po infekci buněk MPyV bylo zjištěno zvýšené množství mRNA pro IL-6 ve všech zvolených časech. V čase 2 hodiny po infekci byl nárůst na stejné úrovni s kontrolou MOCK.

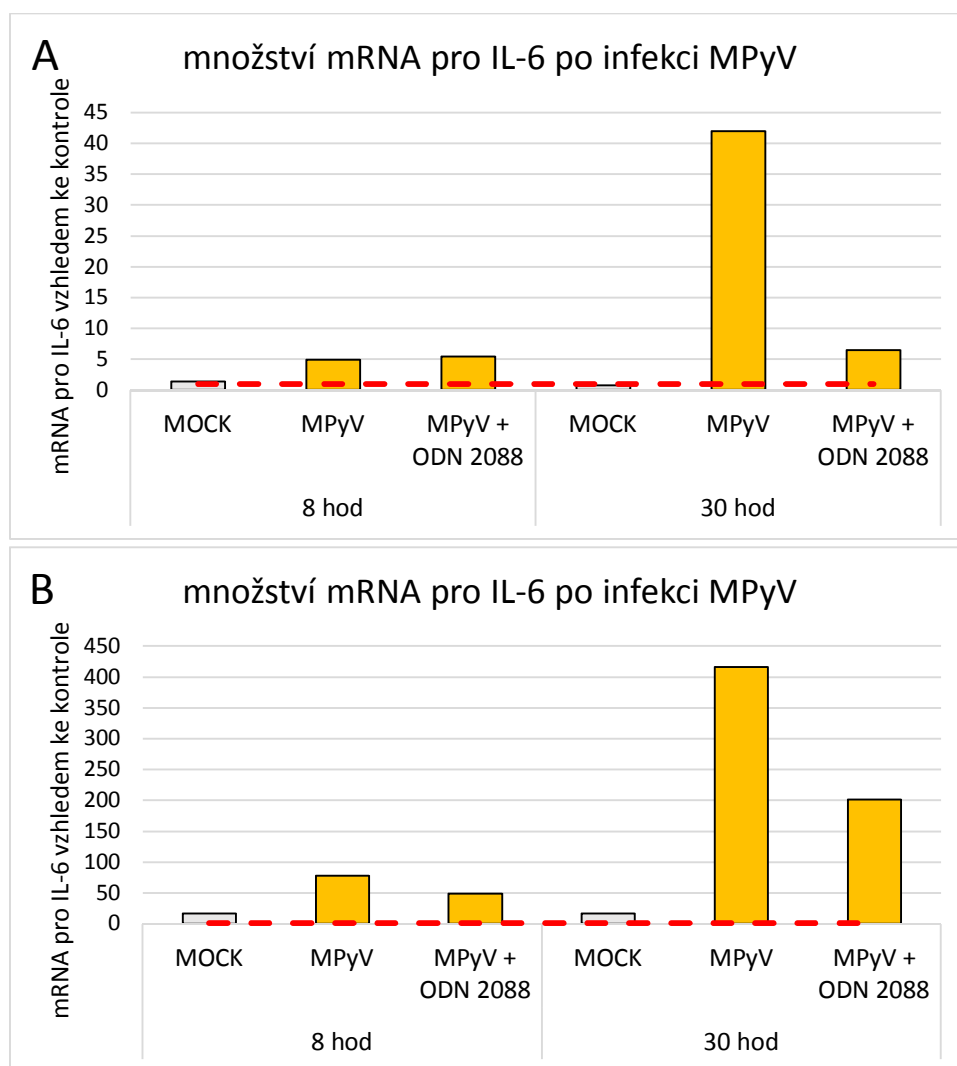
Efekt ODN 2088 jsme sledovali ve dvou časových bodech. V časné fázi 8 hodin po infekci, po průchodu virionů endozomálním systémem a v pozdní fázi infekce, 30 hodin po infekci. Synchronizované buňky MEF na 6 jamkové desce byly hodinu inkubovány v přítomnosti

ODN 2088 (10 $\mu$ M) a poté infikovány MPyV (II. frakce, MOI: 1). Infekce probíhala v přítomnosti ODN 2088. Jako kontrola byly použity synchronizované buňky MEF infikované MPyV. Po izolaci RNA z buněk a jejím přepisu do cDNA bylo kvantitativní PCR stanoveno množství mRNA pro IL-6 ve vzorku. V čase 30 hodin po infekci byl ve vzorku s ODN 2088 ve srovnání s kontrolou pozorován pokles počtu kopií IL-6 mRNA (Obrázek 36A, B). V čase 8 hodin po infekci byl pozorován pokles pouze v 1 ze dvou provedených experimentů (Obrázek 36B). Ve druhém případě bylo v přítomnosti ODN 2088 po 8 hodinách zjištěno větší množství mRNA než v kontrole (o 9,3 %) (Obrázek 36A).



**Obrázek 35: Odpověď buněk MEF na MPyV**

Synchronizované buňky MEF byly infikovány MPyV (II. frakce, MOI: 1). Jako kontrola MOCK k infekci byla použita izolace MII. Z buněk byla izolována RNA (A) 2 – 10 hod po infekci nebo (B) 30 hod po infekci. RNA byla následně přepsána do cDNA. Kvantitativní PCR bylo stanoveno množství mRNA pro IL-6 ve vzorku vzhledem k negativní kontrole (v (A) znázorněna červenou linií). Jako negativní kontrola byly použity synchronizované buňky MEF. Výsledky byly normalizovány k referenčnímu genu HGPRT.



**Obrázek 36: Vliv ODN 2088 na odpověď buněk MEF na MPyV**

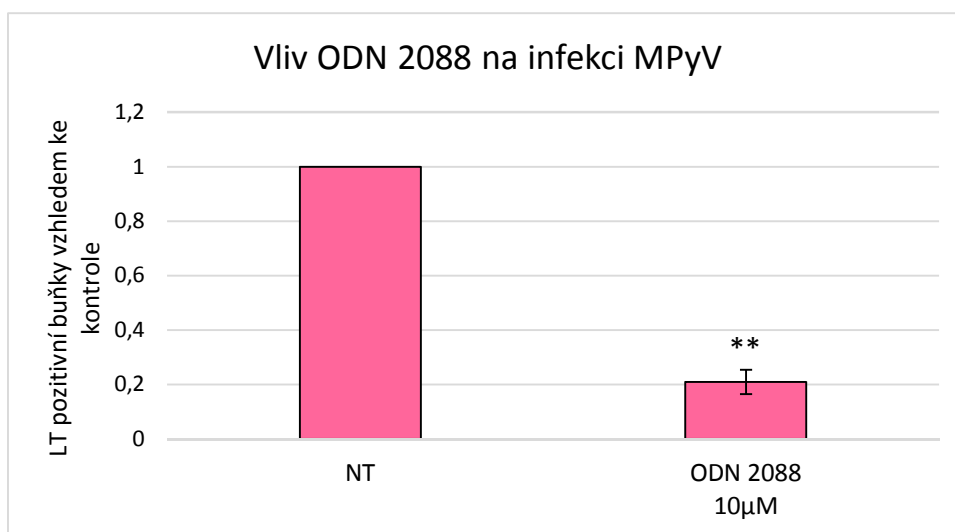
**A, B:** Synchronizované buňky MEF byly kultivovány s ODN 2088 (10 $\mu$ M) nebo v médiu DMEM s 0,5% sérem. Hodinu po zahájení inkubace byly infikovány MPyV (II. frakce, MOI: 1) Z buněk byla izolována RNA (8 a 30 hodin po infekci) a přepsána do cDNA. Jako negativní kontrola byla izolována RNA ze synchronizovaných buněk MEF. Kvantitativní PCR bylo zjištěno množství mRNA pro IL-6 ve vzorcích vzhledem k negativní kontrole (červená linie). Výsledky byly normalizovány k referenčnímu genu GAPDH.

#### 5.4.7 Vliv ODN 2088 na infekci MPyV

Výsledky získané v naší laboratoři V. Janovcem ukázaly, že ODN 2088 inhibuje virovou infekci. Tyto pokusy byly zopakovány a byl zjištěn vliv ODN 2088 na počet infikovaných buněk MEF 20 hodin po infekci.

Synchronizované buňky MEF narostlé na mikroskopických sklíčkách v 24 jamkové desce byly kultivovány v médiu DMEM s 0,5% sérem s přidáním ODN 2088 (10 $\mu$ M). Po 1 hodině byly infikovány MPyV (II. frakce, MOI: 1). ODN 2088 byly v médiu přítomny během celého trvání infekce. Jako kontrola byly použity synchronizované buňky MEF infikované MPyV. 20 hodin po infekci byly buňky zafixovány a bylo provedeno značení LT antigenu. Byl porovnán počet

LT pozitivních buněk v experimentálním a kontrolním vzorku. V souladu s dříve získanými výsledky bylo pozorováno, že přítomnost ODN 2088 významně inhibuje infekci MPyV (Obrázek 37).



**Obrázek 37: Vliv ODN 2088 na časnou fázi infekce MPyV**

Počet buněk infikovaných MPyV. Vztaženo ke kontrole.

Synchronizované buňky MEF byly hodinu inkubovány v médiu DMEM s 0,5% sérem s přidanými ODN 2088 (10µM). Poté byly infikovány MPyV (II. frakce, MOI: 1). Jako kontrola byly MPyV infikovány synchronizované buňky MEF (NT). Po 20 hodinách bylo provedeno nepřímé imunofluorescenční značení virového antigenu LT. Pod fluorescenčním mikroskopem byly spočítány buňky z 15 optických polí na vzorek.

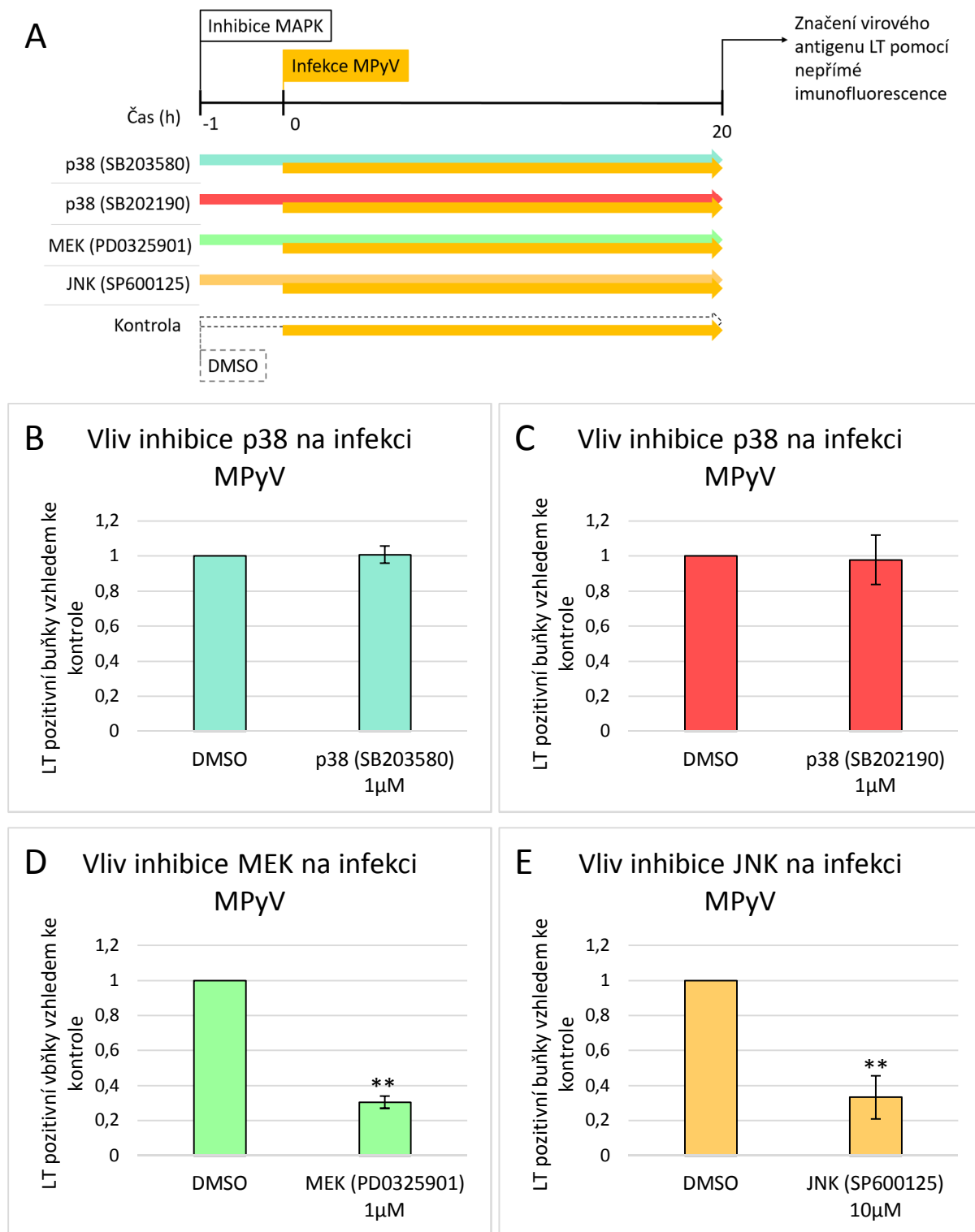
Data jsou prezentována jako průměrná hodnota ze tří nezávislých experimentů  $\pm$  směrodatná odchylka. Statistická signifikance byla stanovena nepárovým t-testem. Hodnota  $P < 0,01$  (\*\*) byla považována za signifikantní.



## 5.5 Vliv inhibitorů MAP kinázových signalizačních drah na infekci MPyV

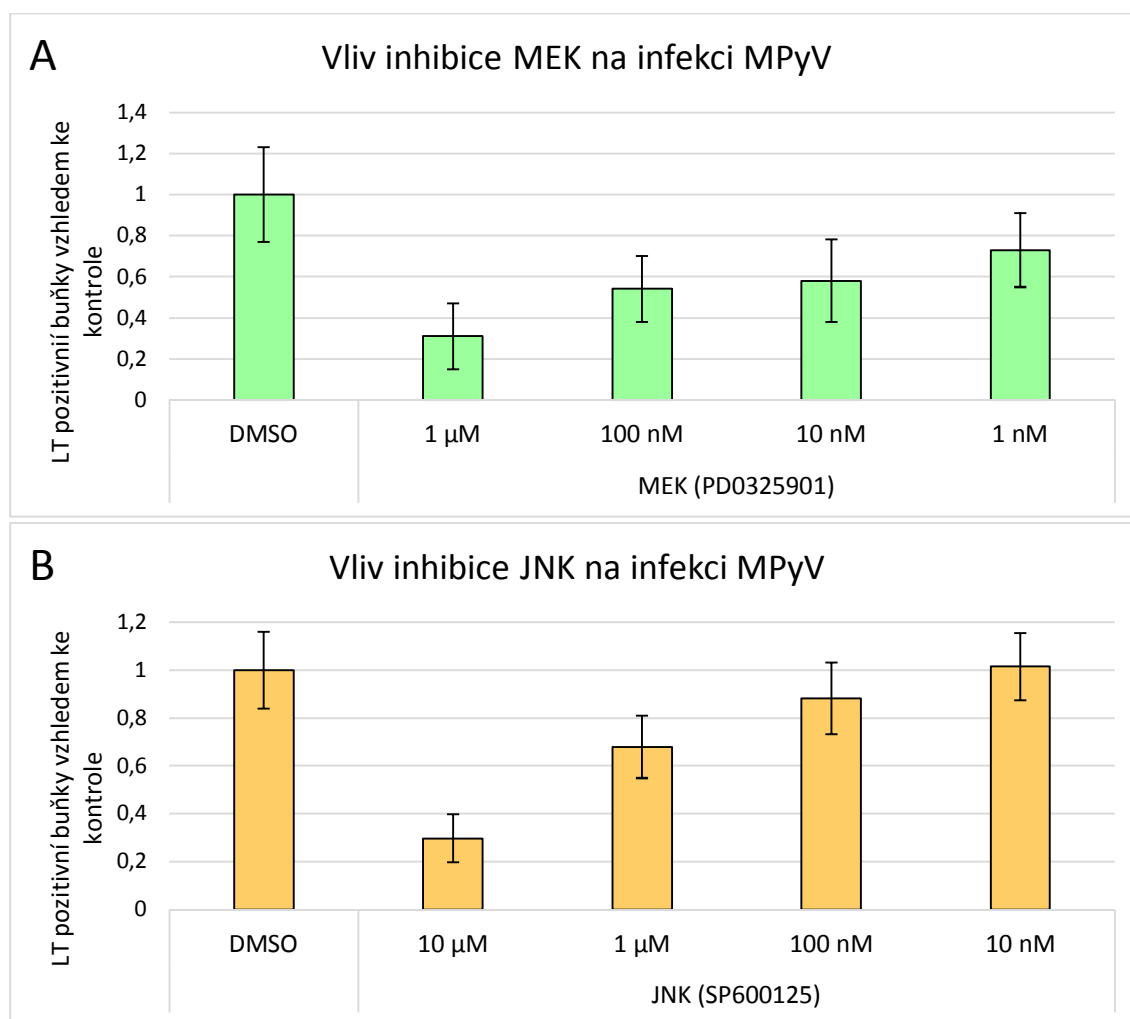
Infekce MPyV v hostitelské buňce moduluje aktivitu celé řady signalizačních drah, přičemž některé z nich jsou nezbytné pro produktivní virovou infekci. Jedním z důsledků virové infekce je i aktivace MAP kináz. (O'Hara & Garcea, 2016) Využití inhibitorů MAPK vedlo k popsání významu MAP kinázové signalizace pro infekci některými lidskými polyomaviry (Ravichandran *et al.*, 2007; Seamone *et al.*, 2010). Zajímalo nás, jak infekci MPyV ovlivní inhibitory MAP kináz p38 (SB203580 a SB202190), MEK (PD0325901) a JNK (SP600125). Buňky MEF byly ponechány narůst na mikroskopických sklíčkách ve 24 jamkové desce do přibližně 40 % konfluence a byly synchronizovány. Poté byly inkubovány v médiu DMEM s 0,5% sérem s inhibitorem p38 SB203580 (1 $\mu$ M) nebo SB202190 (1 $\mu$ M), kinázy MEK PD0325901 (1 $\mu$ M), nebo JNK SP600125 (10 $\mu$ M). Všechny inhibitory byly rozpuštěny v DMSO, kontrolní buňky byly proto kultivovány v médiu s přidaným DMSO o stejné finální koncentraci, jako buňky s příslušným inhibitorem. Po hodinové inkubaci byly buňky infikovány MPyV (II. frakce, MOI: 1). Infekce probíhala v přítomnosti inhibitoru nebo DMSO (Obrázek 38A).

Po 20 hodinách infekce byly buňky zafixovány a na sklíčkách bylo provedeno nepřímé imunofluorescenční barvení proteinu LT. Počet buněk infikovaných v přítomnosti inhibitoru byl porovnán s kontrolou. Zatímco inhibice kinázy p38 (Obrázek 38B, C) neměla na počet infikovaných buněk vliv, v případě použití inhibitoru kinázy MEK nebo JNK, byl pozorován signifikantně nižší počet buněk produkujících LT než na kontrolním sklíčku (Obrázek 38D, E). Efekt inhibice MEK a JNK byl poté měřen i s různými koncentracemi inhibitoru (1nM – 1 $\mu$ M PD0325901 a 10nM - 10 $\mu$ M SP600125). Experiment byl proveden stejně jako předchozí (Obrázek 38A). Po srovnání počtu buněk produkujících virový antigen LT byl pozorován trend, kdy míra inhibice infekce závisela na koncentraci inhibitoru (Obrázek 39A, B).



**Obrázek 38: Vliv inhibice MAPK na infekci MPyV**

**A:** Schéma experimentu. Synchronizované buňky MEF byly hodinu inkubovány v médiu DMEM s 0,5% sérem a přidáním inhibitorem MAPK nebo DMSO. Poté byly infikovány MPyV (II. frakce, MOI: 1). Po 20 hodinách bylo provedeno nepřímé imunofluorescenční značení virového antigenu LT. **B, C, D, E:** Počet buněk infikovaných MPyV. Vztaženo ke kontrole. Pro všechny vzorky byly spočítány buňky z alespoň 20 optických polí. Data jsou prezentována jako průměr ze tří nezávislých experimentů  $\pm$  směrodatná odchylka. Statistická signifikance byla stanovena nepárovým t-testem. Hodnota  $P < 0,01$  (\*\*) byla považována za signifikantní.

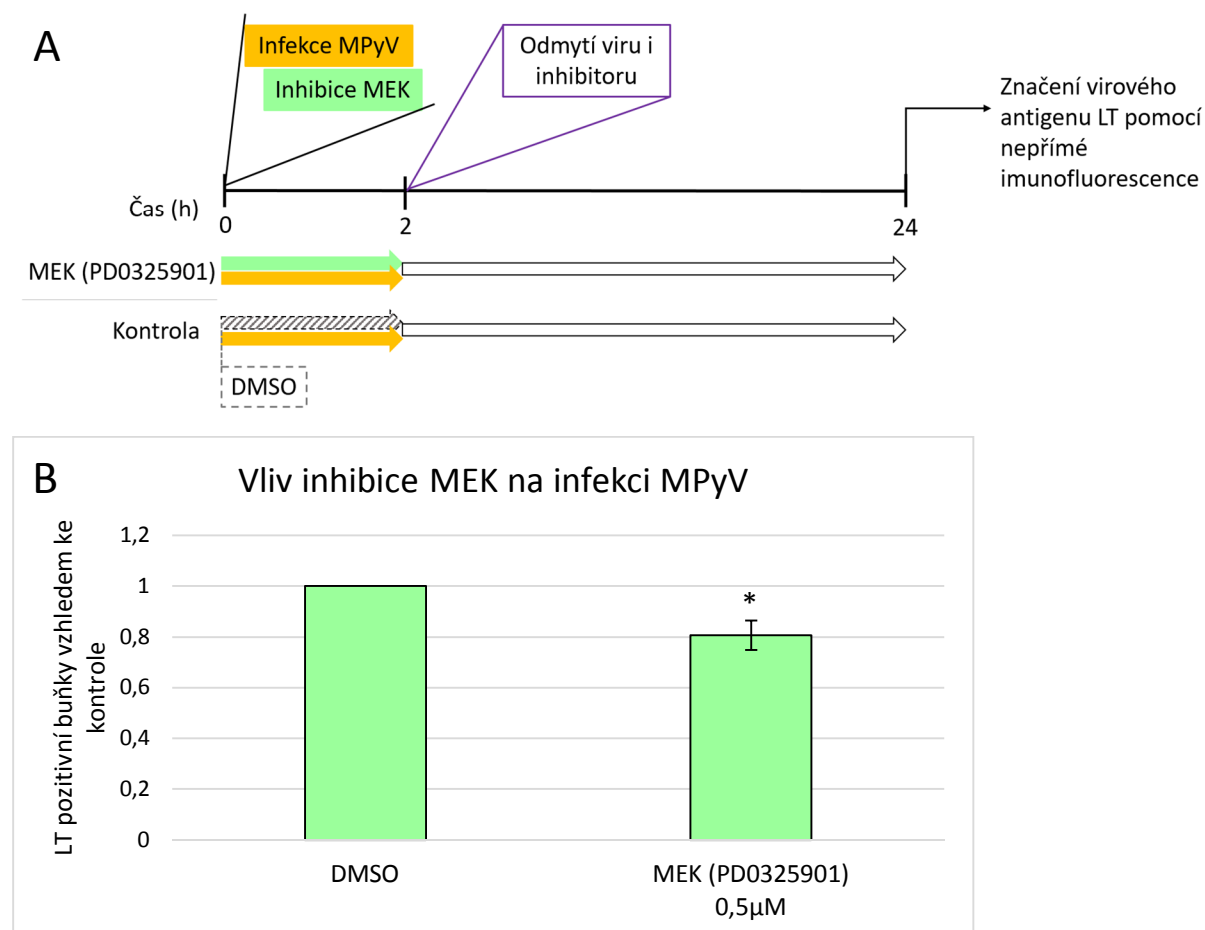


**Obrázek 39: Vliv inhibice MAPK na infekci buněk MEF MPyV**

Průměrný počet LT pozitivních buněk na sklíčku vzhledem ke kontrole  $\pm$  směrodatná odchylka. Synchronizované buňky MEF byly hodinu preinkubovány s (A) PD0325901 (1nM – 1μM) nebo (B) SP600125 (10nM – 10 μM) a pak byly infikovány MPyV (II. frakce, MOI:1). Jako kontrola k inhibitorům bylo použito DMSO. Značení LT antigenu bylo provedeno 20 hodin po infekci. Pro všechny vzorky byly spočítány buňky z 20 optických polí.

V minulém roce byla publikována práce, jejíž autoři provedli podobná sledování se závěrem, že inhibice kinázy MEK nemá na infekci buněk MEF MPyV vliv (O'Hara & Garcea, 2016). Autoři této práce zjišťovali efekt inhibitorů kinázy MEK U0126 a PD98059 postupem, který se v některých ohledech lišil od našeho protokolu. Hlavní rozdíl v přístupech byl ten, že v uvedené práci byl inhibitor do buněčného média přidáván společně s MPyV a jak virus, tak inhibitor byly v médiu přítomny jen první dvě hodiny po infekci. Abychom zjistili, zda je rozdíl v námi získaných výsledcích způsoben odlišnostmi v postupu, rozhodli jsme se experiment s inhibitorem MEK PD0325901 zopakovat s mírně upraveným protokolem. PD0325901 (0,5μM) byl k buňkám rovněž přidán zároveň s infekcí MPyV (II. frakce, MOI:1) a dvě hodiny po infekci byl inhibitor a MPyV z buněk odmyt. Zbývající čas infekce byly buňky kultivovány

v médiu DMEM s 0,5% sérem. Počet LT pozitivních buněk byl stanoven nepřímým imunofluorescenčním značením 24 hodin po infekci (Obrázek 40A). I s využitím tohoto postupu byl zjištěn signifikantní pokles počtu infikovaných buněk na které působil inhibitor MEK (Obrázek 40B). Je možné, že rozdíl mezi našimi a publikovanými výsledky je způsoben využitím odlišných inhibitorů MEK.



**Obrázek 40: Vliv inhibice MAPK na infekci buněk MEF MPyV**

**A:** Schéma experimentu. Synchronizované buňky MEF byly infikovány MPyV (II. frakce, MOI: 1). Zároveň byl do média přidán PD0325901 (0,5μM) nebo DMSO. Po dvou hodinách byly virus a inhibitor odmyty. Buňky byly fixovány 24 hodin po infekci byl určen počet infikovaných buněk imunofluorescenčním barvením LT. **B:** Počet buněk infikovaných MPyV, vztaženo ke kontrole. Pro všechny vzorky byly spočítány buňky z 20 optických polí. Data jsou prezentována jako průměr ze tří nezávislých experimentů ± směrodatná odchylka. Statistická signifikance byla stanovena nepárovým t-testem. Hodnota  $P < 0,05$  (\*) byla považována za signifikantní.

## 6 Diskuze

Bylo popsáno, že myší makrofágy rozpoznávají MPyV prostřednictvím TLR4 a tato interakce hraje klíčovou roli v polarizaci imunitní odpovědi na virovou infekci (Velupillai *et al.*, 2012). V této práci jsme se zabývali tím, zda k interakci MPyV a TLRs dochází i během infekce buněk myších embryonálních fibroblastů a jak interakce s TLRs ovlivní infekci buněk MEF.

Prvním cílem této práce bylo popsat, zda buňky MEF mohou rozpoznávat MPyV pomocí Toll-like receptorů. Nejprve jsme zjišťovali, zda buňky MEF odpovídají na infekci MPyV produkcí cytokinů. Sledovali jsme koncentraci prozánětlivého cytokinu IL-6. Syntézu tohoto cytokinu stimulují signální dráhy, které mohou být aktivovány mimo jiné z TLRs (Shrnuto v Takeuchi & Akira, 2010). Metodou ELISA byla měřena koncentrace IL-6 v médiu odebraném z buněk 24 hodin po infekci. V našich experimentech jsme pozorovali, že buňky MEF odpovídají na infekci MPyV produkcí IL-6, a že tato odpověď závisí na multiplicitě virové infekce.

Pro ověření možné role TLR4 v této odpovědi, jsme se rozhodli zjistit, zda produkci cytokinu IL-6 ovlivní inhibice signalizace z TLR4 pomocí chemického inhibitoru CLI-095, který specificky inhibuje vnitrobuněčnou signalizaci z TLR4 nebo pomocí LPS-RS, lipopolysacharidu z bakterie *Rhodobacter sphaeroides*, který je antagonistou TLR4. Přítomnost CLI-095 (1  $\mu$ M) nebo LPS-RS (10  $\mu$ g/ml) v buněčném médiu kompletně inhibovala produkci IL-6 po infekci buněk MPyV o multiplicitě infekce 10. Tyto výsledky naznačily, že stejně jako makrofágy mohou i buňky MEF rozpoznávat MPyV prostřednictvím TLR4.

Bylo popsáno, že buňky myších makrofágů reagují produkcí cytokinů stejně na viriony MPyV i na VP1 VLPs produkované pomocí rekombinantního bakulovirového systému v buňkách Sf9 (Velupillai *et al.*, 2006). Autoři této práce později ukázali, že v případě infekčních virionů byla produkce cytokinů zprostředkována TLR4 (Velupillai *et al.*, 2012). Zda má odpověď na VLPs stejný mechanismus nebylo v uvedené práci zjišťováno.

Naše pokusy ukázaly, že u buněk MEF se odpověď liší. Zatímco po infekci buněk MEF MPyV ( $10^5$  částic na buňku) byla metodou ELISA 24 hodin po infekci zjištěna přítomnost IL-6 v médiu, po stimulaci buněk MEF VP1 VLPs se nám nepodařilo zjistit produkci IL-6 ani při použití koncentrace  $10^7$  částic na buňku.

Protože produkce cytokinu IL-6 byla inhibována použitím inhibitoru signalizace z TLR4, receptoru, který rozpoznává lipidy a proteiny na povrchu buňky, zaměřili jsme se při hledání příčiny rozdílu v odpovědi buněk MEF na rozdíly ve struktuře virionu MPyV a VP1 VLPs.

VLPs tvoří kapsidové struktury s ikosahedrální symetrií stejně jako MPyV. Povrchová morfologie kapsidových struktur se ovšem může lišit v závislosti na tom, jaké proteiny a DNA jsou enkapsidovány (Lipin *et al.*, 2008; Pease *et al.*, 2009). Vlastnosti VLPs mohou záviset i na přítomnosti minoritních virových proteinů, které mohou ovlivnit vazbu částice na povrch buněk. Pouze VLPs, které obsahují i kapsidový protein VP2 mohou inhibovat infekci MPyV, pravděpodobně tak, že s viriony kompetují o vazebná místa (An *et al.*, 1999). O vazbě MPyV a TLR4 je známo pouze to, že je zprostředkována kyselinou sialovou (You *et al.*, 2015).

Abychom ověřili, zda v rozpoznání virové kapsidy buňkami MEF hraje roli přítomnost minoritních proteinů, zjišťovali jsme odpověď buněk na VLPs tvořené všemi kapsidovými proteiny (VP1/2/3 VLPs). Nejvyšší koncentrace VP1/2/3 VLPs, kterou jsme testovali byla  $10^6$  částic na buňku. Ani stimulace touto koncentrací ovšem po 24 hodinách nevedla k produkci detekovatelného množství IL-6.

Dále jsme se proto rozhodli prověřit možnost, že interakce MPyV s TLR4 není zprostředkována samotnými virovými proteiny, ale některým buněčným proteinem navázaným na kapsidu. Zatímco k pomnožení a izolaci MPyV jsme používali linii myších fibroblastů 3T6, pro tvorbu VP1 VLPs a VP1/2/3 VLPs byly využity hmyzí buňky Sf9. Proto jsme připravili 2 frakce VP1/3 VLPs, které byly izolovány z buněk 3T6 a sledovali jsme produkci IL-6 po stimulaci buněk MEF těmito částicemi. Předběžné výsledky z jednoho experimentu ukázaly produkci IL-6 po stimulaci buněk MEF II. frakcí VP1/3 VLPs ( $10^6$  částic na buňku), ale IL-6 nebyl detekován po stimulaci buněk III. frakcí VP1/3 VLPs ( $10^6$  částic na buňku). Frakce II VP1/3 VLPs by tak mohla obsahovat protein, který aktivuje odpověď buněk MEF a který v izolacích z buněk Sf9 chybí.

Bylo popsáno, že virový protein VP1 může interagovat s různými buněčnými proteiny, transkripčním faktorem YY1 (Palková *et al.*, 2000), enzymem PARP-1 (Carbone *et al.*, 2006), karyopheriny (Bird *et al.*, 2008) nebo chaperony HSC70 (Cripe *et al.*, 1995; Chromy *et al.*, 2003) a HSP90 (Horníková *et al.*, 2017). Kandidátními proteiny, které by mohly být zodpovědné za odpověď buněk MEF jsou proteiny HSP (proteiny teplotního šoku), které byly popsány jako endogenní ligandy TLR4 (Chung *et al.*, 2009; Thuringer *et al.*, 2011; Vabulas *et al.*, 2002). Otázka aktivace signalizace z TLRs prostřednictvím proteinů HSP ale zůstává kontroverzní, kvůli obavám o možnou kontaminaci testovaných rekombinantních HSP bakteriálním lipopolysacharidem (Shrnuto v Tsan & Gao, 2009).

Z důvodu nízkých výtěžků při izolaci VLPs z buněk 3T6 bude v první řadě nezbytné izolaci zopakovat, aby mohlo být ověřeno, zda buňky MEF skutečně odpovídají na stimulaci takto připravenými částicemi a případně zjištěno, zda v odpovědi hraje roli TLR4.

Studium odpovědi buněk MEF na VLPs by nám pak mohlo pomoci lépe porozumět tomu, jak probíhá rozpoznání MPyV. Studium interakce VLPs a imunitního systému má navíc význam i z toho důvodu, že VLPs tvořené proteiny myšího polyomaviru jsou zkoumány i z hlediska jejich možného využití v medicíně, např. pro cílení a dopravu léčiv do buněk.

Dalším cílem této práce bylo zjistit, jak signalizace z TLR4 ovlivní infekci buněk MEF myším polyomavirem. Sledovali jsme, jak přítomnost CLI-095 nebo LPS-RS ovlivní množství buněk infikovaných MPyV (MOI: 1) 20 hodin po infekci. Sledován byl také efekt agonisty TLR4, LPS. Počet infikovaných buněk byl stanoven nepřímým imunofluorescenčním značením virového LT antigenu.

Molekula CLI-095 inhibuje signalizaci z TLR4 vazbou na intracelulární doménu receptoru, která brání interakci TIR domény s adaptorovými molekulami (Li *et al.*, 2006; Matsunaga *et al.*, 2011).

Rozdíl ve schopnosti LPS a LPS-RS aktivovat imunitní odpověď je daný odlišnostmi ve struktuře těchto lipopolysacharidů, konkrétně ve struktuře jejich lipidové části, lipidu A. Imunogenicita lipopolysacharidů závisí na míře acylace lipidu A, na počtu připojených mastných kyselin. Zatímco lipopolysacharid z *E-coli* je hexa-acylovaný, LPS-RS je penta-acylovaný. Pro antagonismus LPS-RS je klíčová vazba na protein MD-2. (Coats *et al.*, 2005; Golenbock *et al.*, 1991; Teghanemt *et al.*, 2005) Jedna starší práce popisuje i možnou roli interakce s CD14 (Jarvis *et al.*, 1997).

Když byla signalizace z TLR4 inhibována použitím inhibitoru CLI-095 (1  $\mu$ M), nebyl v počtu LT pozitivních buněk pozorován rozdíl. Pokud ale infekce probíhala v přítomnosti antagonisty TLR4 LPS-RS (10  $\mu$ g/ml), byl pozorován signifikantně nižší počet infikovaných buněk než v kontrolním vzorku. Rozdíl činil téměř 70 %. Také během testování působení LPS (10 ng/ml – 10  $\mu$ g/ml) na infekci byl pozorován trend, kdy byl v přítomnosti LPS infikován nižší počet buněk než v kontrole. Při koncentraci LPS 1  $\mu$ g/ml byl pozorován pokles počtu infikovaných buněk o 25 %.

Dva druhy lipopolysacharidů, které mají opačný vliv na signalizaci z TLR4, tak měly podobný vliv na infekci. Domníváme se, že LPS a LPS-RS by mohly ovlivnit infekci MPyV kompeticí o vazbu povrchové molekuly důležité pro infekci.

Molekuly, které virus naváže na povrchu buňky, rozhodují o osudu virionu. Bylo zjištěno, že viry mohou do buňky vstupovat různými endocytickými drahami, ale většina z nich je pro virus neinfekční. Zásadní pro produktivní infekci je vazba jednoho z gangliosidů, které slouží jako

receptor pro virus. (Buch *et al.*, 2015; Tsai *et al.*, 2003; You *et al.*, 2015) Samotná vazba na gangliosid ovšem nemusí být pro infekci dostatečná.

Některé práce mluví o integrinu  $\alpha 4$  jako o možném koreceptoru MPyV. V těchto pracích bylo ukázáno, že inhibice interakce MPyV s integrinem vede k poklesu infekitivity viru až o 60 % (Caruso *et al.*, 2003, 2007; O'Hara & Garcea, 2016). Jedna z popsaných rolí integrinu  $\alpha 4$  v infekci spočívá v tom, že po navázání virionu zprostředkovává aktivaci signalizačních drah, které jsou důležité pro virovou infekci (O'Hara & Garcea, 2016).

Molekuly, které virion naváže na povrchu buňky jsou důležité i z hlediska směřování transportu virionu buňkou. Produktivní infekce vyžaduje průchod virové částice časnými a pozdními endozomy, a následný transport virionů do endoplazmatického retikula (Gilbert & Benjamin, 2004; Liebl *et al.*, 2006; Lilley *et al.*, 2006; Žíla *et al.*, 2014). Velké množství virových částic ovšem není dopraveno až do ER a je degradováno v lysozomu. Bylo popsáno, že molekuly, které jsou internalizovány společně s virionem, rozhodují o tom, zda bude virion směřován do ER anebo k degradaci. Qian a kolektiv (2009) postulovali, že transport do ER mohou zajistit gangliosidy GD1a. Další práce této výzkumné skupiny popisuje, že směřování virionu mohou ovlivnit i některé glykoproteiny na povrchu buňky, které by mohly sehrát roli určité „návnady“ do neproduktivní cesty (Qian & Tsai, 2010).

Povrchové molekuly tak hrají významnou roli hned na několika úrovních, které zahrnují vazbu virionu na buňku, internalizaci částice, aktivaci signalizačních drah z plazmatické membrány či směřování transportu částice buňkou.

Otázkou je, interakcí se kterou konkrétní molekulou by mohly LPS a LPS-RS ovlivnit virovou infekci. Jednou z možností je vazba na některý z proteinů, který hraje roli v aktivaci signalizačního komplexu TLR4. Mezi tyto proteiny patří MD-2, komplex MD-2/TLR4 nebo CD-14.

Můžeme spekulovat, zda přidané lipopolysacharidy nemohou interagovat například s integriny, které jsou důležité pro infekci MPyV. Bylo popsáno, že některé typy integrinů mohou vázat LPS a tato odpověď může hrát roli v imunitní odpovědi. K rozpoznání LPS mohou sloužit například  $\beta 2$  integriny (Flaherty *et al.*, 1997), které jsou ovšem exprimovány výhradně na leukocytech (Shrnuto v Barczyk *et al.*, 2010). V posledních letech bylo objeveno hned několik dosud nepopsaných typů řetězců integrinů, které navíc mohou vázat LPS, a které jsou exprimovány na různých buněčných typech. Žádný z těchto nově popsaných integrinů ovšem nebyl objeven na savčím druhu. (Huang *et al.*, 2015; Jia *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2016) Pro nás by mohl být zajímavý integrin  $\alpha \nu \beta 3$ , který je exprimován i na buňkách MEF (Schmidt *et*



*al.*, 2013) a o kterém bylo popsáno, že se může podílet na odpovědi na LPS (Gianni & Campadelli-Fiume, 2014).

K zodpovězení otázky, zda může mezi MPyV a lipopolysacharidy docházet ke kompetici o interakci s nějakou molekulou na povrchu buňky, by mohlo pomoci ověření efektu LPS a LPS-RS na infekci přidáním lipopolysacharidů do média až po internalizaci virionů.

LPS by mohl virovou infekci ovlivnit také aktivací signalizace ze signalizačního komplexu TLR4 a adaptorové molekuly TRIF vedoucí k syntéze interferonů typu I (Fitzgerald *et al.*, 2003; Yamamoto *et al.*, 2003a, b). Případná interakce lipopolysacharidů s některou další molekulou, kromě proteinů signalizačního komplexu TLR4, by mohla infekci MPyV ovlivnit také vyvoláním buněčné odpovědi nesouvisející s TLR4.

Otázkou zůstává, zda infekci MPyV ovlivní signalizace z TLR4. Inhibice této signalizační dráhy prostřednictvím CLI-095 neměla vliv na počet buněk produkujících virový antigen LT. Počet infikovaných buněk byl zjišťován pomocí fluorescenční mikroskopie 20 hodin po infekci. Tato metoda umožňuje stanovit, zda buňka je, anebo není infikovaná MPyV.

Je možné, že efekt signalizace z TLR4 na virovou infekci nelze touto metodou zjistit. Aktivace signalizace by totiž mohla například pouze urychlit průběh virového replikačního cyklu nebo zvýšit míru exprese genů pro virové T antigeny. S prověřením této možnosti by mohla pomoci metoda, která nám umožní nejen stanovit, zda je buňka LT pozitivní, ale také signál kvantifikovat. Jednou možností by mohla být kvantifikace signálu pomocí průtokové cytometrie.

Je hned několik možných způsobů, jakými by mohla signalizace z TLR4 replikaci MPyV podpořit. Bylo popsáno, že stejně jako signalizace z TLR5 i aktivace TLR4 může stimulovat proliferaci fibroblastů (Hasan *et al.*, 2005, 2007). Myší polyomavirus, který pro svou replikaci vyžaduje hostitelské faktory, které jsou v buňce dostupné během S fáze buněčného cyklu, by tak mohl využívat aktivaci TLR4 jako proliferační stimul pro buňku. Proliferační efekt signalizace z TLR4 je ovšem inhibován interferony typu I (Hasan *et al.*, 2007). Výsledky získané v naší laboratoři ale ukázaly, že k produkci interferonů typu I, dochází až od 24 hodin po infekci (Huérfano *et al.*, nepublikované výsledky).

Proliferační efekt mohou mít také cytokiny syntetizované po infekci MPyV. V této práci jsme ukázali, že po infekci MPyV dochází k produkci IL-6. Studie sledující vliv IL-6 a dalších prozánětlivých cytokinů na myší fibroblasty popsala jejich proliferační efekt, který byl z testovaných cytokinů nejsilnější u TNF- $\alpha$  (Kendall *et al.*, 1997). Schopnost IL-6 aktivovat dělení buněk je studována také v souvislosti s řadou lidských onemocnění (Shrnuto v Kumari

*et al.*, 2016). Signalizace z TLR4 také vede k aktivaci MAP kináz ERK a JNK. V našich experimentech jsme popsali význam aktivace těchto MAPK pro virovou infekci (viz dále).

Popsané důsledky aktivace TLR4 by mohly mít pozitivní efekt na replikaci MPyV. Je ale potřeba uvážit, že během infekce MPyV dochází k ovlivnění replikačního cyklu buňky a buněčné signalizace i dalšími mechanismy a signalizace z TLR4 by tak měla pouze dílčí efekt. Nabízí se ale i další možnosti, jakými by interakce s TLR4 mohla ovlivnit infekci MPyV.

Otázka, kterou jsme se v této práci nezabývali, je, zda může být MPyV stejně jako LPS po vazbě TLR4 internalizován se signalizačním komplexem TLR4 do endozomu (Kagan *et al.*, 2008; Tanimura *et al.*, 2008; Zanoni *et al.*, 2011). V budoucnu jsou v naší laboratoři plánovány pokusy, které by mohly pomoci tuto otázku zodpovědět sledováním kolokalizace MPyV a TLR4. Endocytóza po vazbě TLR4 by mohla představovat jednu z neinfekčních drah, které svádí část virionů k degradaci v lysozomech.

TLR4 by tak mohl na povrchu fibroblastů plnit roli určitého „pseudoreceptoru“ inhibujícího infekci. Byl popsán rozdíl v patogenezi kmenů MPyV *in vivo* v závislosti na tom, s jak širokým spektrem povrchových molekul byly tyto viry schopné interagovat. (Rozdíl ve vazebných schopnostech jednotlivých kmenů byl způsoben mutacemi kapsidového proteinu VP1.) U kmenů MPyV, které vázaly větší počet typů povrchových molekul, byla pozorovaná omezená schopnost šířit se v hostiteli. V důsledku pak byly tyto viry méně patogenní. (Bauer *et al.*, 1999) Podobným mechanismem by infekci MPyV mohl omezovat i TLR4.

Skutečnost, že produkce IL-6 indukovaná MPyV byla zcela inhibována prostřednictvím CLI-095, naznačila, že TLR4 hraje v odpovědi buněk MEF na MPyV klíčovou roli. Chtěli jsme ale ověřit, zda se na odpovědi nemůže alespoň částečně podílet i jiný TLR.

Dalším Toll-like receptorem, jehož možné zapojení do rozpoznání MPyV jsme se rozhodli prozkoumat, byl TLR9. Na TLR9 jsme se zaměřili z toho důvodu, že pro replikační cyklus MPyV je nezbytný průchod virionu endozomálním systémem a v sekvenci genomu MPyV, který je tvořen dsDNA, najdeme i CpG dinukleotidy (Shrnuto v Hoelzer *et al.*, 2008). Bylo popsáno, že buňky MEF odpovídají na stimulaci TLR9 produkcí prozánětlivých cytokinů (Kurt-Jones *et al.*, 2004).

Pro studium zapojení TLR9 v odpovědi buněk MEF na MPyV jsme se rozhodli použít jiný způsob než měření koncentrace IL-6 metodou ELISA. Při použití této metody jsme totiž nebyli schopni detekovat odpověď ani na pozitivní kontrolu – stimulaci buněk pomocí imunostimulačních oligonukleotidů ODN 1668. Proto jsme pro stanovení signalizace z TLR9 kvantifikovali mRNA pro IL-6 prostřednictvím kvantitativní PCR.

Testovali jsme, zda přítomnost ODN 2088 v médiu během infekce MPyV ovlivní množství mRNA pro IL-6 po virové infekci. ODN 2088 je antagonistou TLR9. Jedná se o oligonukleotidy s fosforothiotátovou kostrou, schopné neutralizovat odpověď indukovanou oligodeoxynukleotidy s imunostimulačním CpG motivem. (Stunz *et al.*, 2002)

Ve dvou provedených experimentech byl pozorován pokles mRNA pro IL-6 ve srovnání s kontrolou 30 hodin po infekci. V jednom experimentu pokles činil 85 % a ve druhém 52 %. V čase 8 hodin po infekci byl pokles v množství mRNA zjištěn pouze v jednom experimentu ze dvou.

Rovněž jsme otestovali, jak ODN 2088 ovlivní počet infikovaných buněk. Ten byl stanoven 20 hodin po infekci nepřímým fluorescenčním značením virového antigenu LT. Přidání ODN 2088 vedlo k statisticky signifikantnímu poklesu počtu LT pozitivních buněk. Ve srovnání s kontrolou byl zjištěn pokles o téměř 80 %.

Výsledky získané z těchto experimentů se obtížně interpretují. Skutečnost, že přítomnost ODN 2088 v médiu vedla k inhibici infekce MPyV o takřka 80 % vyvolává obavy o možný nespecifický efekt ODN 2088. Pozorovaný pokles množství mRNA pro IL-6 by pak nebyl zapříčiněn inhibicí signalizace z TLR9, ale skutečností, že v buňkách neprobíhala infekce. Obdobná situace byla popsána pro lidský cytomegalovirus. Během studia tohoto viru bylo zjištěno, že oligodeoxynukleotidy s fosforothiotátovou kostrou inhibují vstup viru do fibroblastů a endoteliálních buněk po vazbě virionu na receptor. Konkrétní mechanismus, jakým tato inhibice probíhá nebyl dosud popsán. Popsaný efekt byl ale oslaben, pokud byly použity ODN s fosfodiesterovou kostrou. (Iversen *et al.*, 2009; Luganini *et al.*, 2008)

Je nezbytné položit si otázku, jak velký je potenciál MPyV aktivovat signalizaci z TLR9. Přestože v genomu obsahuje CpG dinukleotidy, stejně jako u dalších savčích polyomavirů je jejich množství významně potlačeno (Upadhyay & Vivekanandan, 2015). O aktivaci imunitní odpovědi navíc rozhoduje i sekvence v okolí CpG dinukleotidu (Shrnuto v Krieg, 1999). Analýza genomu MPyV provedená Hoelzerovou a kolektivem (2008) ukázala, že z 64 CpG dinukleotidů v genomu MPyV má pouze jeden z nich potenciál stimulovat imunitní odpověď z TLR9.

Bez provedení dalších pokusů není možné odlišit efekt signalizace z TLR9 od případného vedlejšího efektu použitého inhibitoru. Otázky o interakci MPyV a TLR9 by mohly pomoci zodpovědět experimenty s využitím buněčné linie, ve které byl TLR9 odstraněn metodou „genový knockout“ (TLR9<sup>-/-</sup>). Bylo by možné porovnat odpověď wt (wild type, běžný typ) a TLR9<sup>-/-</sup> buněk na MPyV a průběh infekce těchto buněk. Zajímavé by také bylo, otestovat v takto deficientní linii vliv ODN 2088 na infekci MPyV. Pokud by stále docházelo k inhibici

virové infekce, bylo by patrné, že popsáný efekt inhibitoru byl způsobený nespecifickou interakcí. Případný nespecifický efekt inhibitoru by mohl být otestován také použitím kontrolních ODN, které by neobsahovaly imunoinhibiční sekvenci.

### **MPyV a MAP kinázy**

Schopnost aktivovat v hostitelské buňce specifické signalizační dráhy hraje u řady virů významnou roli v jejich replikačním cyklu. Výjimku netvoří ani polyomaviry – například byl popsán význam MAP kinázových signalizačních drah v infekci viry BK, JC a MCPyV (Liu *et al.*, 2016; Ravichandran *et al.*, 2007; Seamone *et al.*, 2010).

Myší polyomavirus může aktivovat MAP kinázovou signalizační kaskádu vazbou na povrch buňky interakcí s gangliosidy nebo integriny (O'Hara & Garcea, 2016). Signalizační dráhy jsou ovlivněny také virovými T antigeny. Ty interagují s řadou buněčných proteinů, které hrají roli v regulaci replikačního cyklu hostitelské buňky nebo v buněčné signalizaci. (Mullane *et al.*, 1998; Rodriguez-Viciano *et al.*, 2006; Urich *et al.*, 1995)

Cílem této práce bylo určit, zda inhibice zvolených MAPK ovlivní časnou fázi replikačního cyklu MPyV po infekci buněk MEF. Sledován byl vliv inhibice kináz p38, JNK a kinázy MEK (tedy kinázy nadřazené v signalizační kaskádě MAPK ERK).

Inhibice kinázy p38 inhibitorem SB203580 nebo SB202190 neovlivnila počet buněk infikovaných MPyV zjišťovaný 20 hodin po infekci. Oproti tomu, po inhibici kinázy JNK inhibitorem SP600125 nebo inhibici MEK pomocí PD0325901 byl zjištěn signifikantně nižší počet LT pozitivních buněk.

Naše výsledky se liší od publikované studie, která popisuje, že inhibice kinázy MEK inhibitorem U0126 nebo PD98059 neovlivňuje počet buněk MEF infikovaných MPyV (O'Hara & Garcea, 2016). Autoři uvedené práce sledovali efekt inhibice ERK za odlišných podmínek. Virus i inhibitor byly přítomny v médiu pouze první dvě hodiny po infekci, zatímco my jsme počet infikovaných buněk sledovali po 20 hodinové infekci, během které byly buňky kultivovány s virem i inhibitorem v médiu. Ovšem i po úpravě našeho protokolu a odmytí viru a PD0325901 2 hodiny po infekci, jsme stále pozorovali signifikantně nižší počet infikovaných buněk než v kontrolním vzorku.

Domníváme se, že pozorovaný rozdíl může být přisouzen použití rozdílných inhibitorů. V literatuře bylo popsáno, že inhibitor PD0325901 je několikanásobně účinnější, než U0126 nebo PD98059 (Bain *et al.*, 2007; Barrett *et al.*, 2008). O'Harová a Garcea (2016) ukázali, že přidání 20 $\mu$ M U0126 k buňkám společně s virem inhibuje virem indukovanou aktivaci ERK 15 minut po infekci. Situace byla odlišná, pokud byly virus a inhibitor 2 hodiny po infekci odmyty

a aktivace ERK zjišťována 24 hodin po infekci. Dvouhodinová přítomnost inhibitoru neměla vliv na detekci fosforylované formy ERK. V práci není prezentováno, zda inhibice PD98059 měla stejný efekt. V minulosti ale byla popsána reverzibilita tohoto inhibitoru (Dudley *et al.*, 1995). Tyto výsledky nasvědčují tomu, že kináza MEK nehraje roli během prvních kroků virové infekce (například v endocytóze virionu). Pro potvrzení tohoto závěru bude nezbytné otestovat, zda aktivitu kinázy ERK v buňkách MEF ovlivňuje odmytí PD0325901 a v jakém čase – zda mohou být naše odlišné závěry způsobeny účinnějším působením PD0325901.

Zjištění, že inhibice MEK pomocí PD0325901 a JNK inhibitorem SP600125 snižuje počet buněk MEF infikovaných MPyV, otevírá otázku, pro který krok virové infekce je aktivita těchto kináz potřebná. Protože byly infikované buňky počítány 20 – 24 hodin po infekci, mohlo dojít k ovlivnění kroků časně fáze infekce, které zahrnují vstup viru do buňky, transport virionu buňkou a časnou transkripci. V tomto čase již může docházet také k replikaci virového genomu (Chen & Fluck, 2001; Mannová & Forstová, 2003).

V minulosti bylo popsáno, že aktivace některých signálních drah hraje významnou roli v transportu virionů v buňce. Vstup viru do buňky je provázen aktivací tyrosin kináz. Bylo postulováno, že tyto kinázy se podílí na destabilizaci aktinové sítě, která je nezbytná pro endocytózu virionu (Liebl *et al.*, 2006; Richterová *et al.*, 2001). Význam tyrosin kináz pro vstup viru do buňky byl později potvrzen využitím inhibitoru genisteinu (O'Hara & Garcea, 2016). Vazba virionu na gangliosidy dále vede k aktivaci kinázy PI3K a signální dráhy FAK/Src. Zatímco PI3K hraje roli v internalizaci MPyV, aktivace FAK/Src je významná pro buněčný transport virionů podél mikrotubulů. (O'Hara & Garcea, 2016)

Zda i aktivace kináz ERK a JNK hraje roli v „traffickingu“ virionů by mohlo být dokázáno otestováním, zda inhibice signalizace ovlivní infekci MPyV v různých časech po infekci. Další možností, jak testovat vliv inhibitorů, je využít skutečnosti, že produktivní infekce MPyV lze dosáhnout po transfekci buněk plazmidem obsahujícím genom MPyV (Krauzewicz *et al.*, 1990). Při sledování vlivu inhibice po transfekci by byl vyloučen případný efekt inhibitorů na fázi dopravy virionů od povrchu buňky do jádra.

Výsledky výzkumu lidských polyomavirů, jejichž infekce je ovlivněna inhibicí MAPK, ukazují, že MAPK hrají roli v replikaci nebo transkripci těchto virů (Liu *et al.*, 2016; Ravichandran *et al.*, 2007; Seamone *et al.*, 2010). Domníváme se, že i v případě MPyV mohou MAPK ovlivnit tyto kroky virového replikačního cyklu.

Replikace MPyV je závislá na buněčných faktorech, které jsou v buňce dostupné zejména během S fáze buněčného cyklu. MAPK jsou klíčovými regulátory buněčného cyklu a kontrolují

transkripci velkého množství buněčných genů. Tato regulace stavu hostitelské buňky tak může rozhodovat o tom, zda je v buňce příznivé prostředí pro virovou replikaci.

Další způsob, jakým by MAPK mohly MPyV ovlivňovat, je aktivací buněčných transkripčních faktorů, které mohou interagovat přímo s virovým genomem. V genomu MPyV je obsažen enhancer, který obsahuje vazebná místa pro proteiny aktivující virovou replikaci a transkripci (Tyndall *et al.*, 1981; Veldman *et al.*, 1985). Významným buněčným regulačním faktorem, který váže virový enhancer je AP-1. Bylo ukázáno, že neporušené vazebné místo pro AP-1 je důležité pro regulaci časně a pozdní transkripce, ale i pro replikaci genomu MPyV (Martin *et al.*, 1988; Yoo *et al.*, 1991).

Po infekci buňky může MPyV ovlivňovat dostupnost tohoto regulačního faktoru díky vlivu MT a ST na expresi buněčných genů (Glenn & Eckhart, 1990; Mullane *et al.*, 1998; Schönthal *et al.*, 1992). V regulaci dostupnosti AP-1 během virové infekce by mohly významnou roli hrát i MAPK.

Syntéza a aktivace AP-1 jsou v buňce regulovány právě MAPK. ERK, p38 i JNK aktivují transkripční faktory (ATF2, MEF2C a další), které indukují syntézu FOS a JUN což vede ke zvýšení množství komplexu AP-1 v buňce. MAPK také mohou AP-1 fosforylovat a tím regulovat jeho aktivitu, stabilitu nebo schopnost vázat DNA. (Shrnuto v Eferl & Wagner, 2003) V buňce se na dostupnosti AP-1 podílí i kináza p38, jejíž inhibice v našich experimentech neovlivnila počet LT pozitivních buněk. Jednotlivé MAPK ovšem mohou mít v indukci AP-1 různě významnou roli.

Na význam MAPK v indukci AP-1 MPyV ukazují i výsledky studie, která se zabývala buněčnou transformací indukovanou virovým MT antigenem (Chen *et al.*, 1999). Tato práce ukázala, že aktivace kinázy PI3K MT antigenem vede k zvýšení exprese genu pro c-FOS a následně i k zvýšené syntéze AP-1. MT antigenem zprostředkovaná aktivace PI3K ale nebyla pro tento efekt zcela postačující a pro zvýšení tvorby c-FOS byla nezbytná i aktivní kináza JNK. Podobný mechanismus využití MAPK v indukci AP-1 byl popsán i u polyomaviru SV40. Virový malý T antigen aktivuje syntézu AP-1 prostřednictvím kináz ERK a JNK (Frost *et al.*, 1994; Watanabe *et al.*, 1996). U SV40 se AP-1 podílí na aktivaci pozdní transkripce (Mermod *et al.*, 1988) a je důležitý také pro navození vstupu hostitelské buňky do S fáze (Sontag *et al.*, 1993; Watanabe *et al.*, 1996).

Vzhledem k tomu, že vazba virionu MPyV na povrch buňky vede k aktivaci kináz ERK a JNK (O'Hara & Garcea, 2016), by tato aktivace mohla představovat první impuls pro syntézu AP-1 a aktivaci transkripce virového genomu, před syntézou virových T antigenů, které se pak podílejí na další regulaci syntézy AP-1.

## 7 Souhrn

Tato práce si kladla za cíl určit, zda buňky MEF rozpoznávají MPyV prostřednictvím Toll-like receptorů a popsat, zda inhibice signalizace z TLR4 nebo TLR9 ovlivní časnou fázi virové infekce.

- Bylo zjištěno, že buňky MEF odpovídají na infekci MPyV produkcí cytokinu IL-6
- Nepodařilo se nám změřit produkci IL-6 po stimulaci buněk MEF VP1 VLPs a VP1/2/3 VLPs produkovanými pomocí bakulovirového expresního systému
- Předběžné výsledky z jednoho experimentu ukázaly produkci IL-6 buňkami MEF po stimulaci VP1/3 VLPs izolovanými ze savčích buněk
- Produkce IL-6 buňkami MEF po infekci MPyV byla kompletně inhibována inhibitorem signalizace z TLR4 CLI-095 a antagonistou TLR4 LPS-RS
- Inhibice signalizace z TLR4 chemickým inhibitorem CLI-095 neměla vliv na počet buněk MEF infikovaných MPyV
- Pokud infekce buněk MEF probíhala v přítomnosti antagonisty TLR4 LPS-RS nebo agonisty TLR4 LPS, byl pozorován nižší počet buněk infikovaných MPyV ve srovnání s kontrolou
- Zvýšení množství mRNA pro IL-6 po infekci MPyV bylo inhibováno ODN 2088
- Byly potvrzeny výsledky získané v naší laboratoři, že antagonist TLR9 ODN 2088 inhibuje virovou infekci

Dalším cílem této práce bylo popsat, zda inhibice vybraných MAP kináz pomocí chemických inhibitorů ovlivní časnou fázi infekce buněk MEF MPyV.

- Bylo zjištěno, že inhibice kinázy p38 (SB203580, SB202190) nemá vliv na počet infikovaných buněk
- Pozorovali jsme, že inhibice kinázy MEK (PD0325901) nebo JNK (SP600125) vede k signifikantnímu poklesu počtu buněk infikovaných MPyV ve srovnání s kontrolou

## 8. Seznam použité literatury

- Adachi, O., Kawai, T., Takeda, K., Matsumoto, M., Tsutsui, H., Sakagami, M., Nakanishi, K. & Akira, S. (1998). Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. *Immunity* **9**, 143–50.
- Ahmad-Nejad, P., Häcker, H., Rutz, M., Bauer, S., Vabulas, R. M. & Wagner, H. (2002). Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments. *Eur J Immunol* **32**, 1958–68.
- Acheson, N. H., Buetti, E., Scherrer, K. & Weil, R. (1971). Transcription of the polyoma virus genome: synthesis and cleavage of giant late polyoma-specific RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **68**, 2231–5.
- Akira, S. & Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* **4**, 499–511.
- An, K., Gillock, E. T., Sweat, J. A., Reeves, W. M. & Consigli, R. A. (1999). Use of the baculovirus system to assemble polyomavirus capsid-like particles with different polyomavirus structural proteins: analysis of the recombinant assembled capsid-like particles. *J Gen Virol* **80** ( Pt 4), 1009–16.
- An, K., Fattaey, H. K., Paulsen, A. Q. & Consigli, R. A. (2000). Murine polyomavirus infection of 3T6 mouse cells shows evidence of predominant necrosis as well as limited apoptosis. *Virus Res* **67**, 81–90.
- Atkin, S. J. L., Griffin, B. E. & Dilworth, S. M. (2009). Polyoma virus and simian virus 40 as cancer models: History and perspectives. *Semin Cancer Biol* **19**, 211–217.
- Awomoyi, A. A., Rallabhandi, P., Pollin, T. I., Lorenz, E., Sztein, M. B., Boukhvalova, M. S., Hemming, V. G., Blanco, J. C. G. & Vogel, S. N. (2007). Association of TLR4 polymorphisms with symptomatic respiratory syncytial virus infection in high-risk infants and young children. *J Immunol* **179**, 3171–7.
- Bain, J., Plater, L., Elliott, M., Shpiro, N., Hastie, C. J., McLauchlan, H., Klevernic, I., Arthur, J. S. C., Alessi, D. R. & Cohen, P. (2007). The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *Biochem J* **408**, 297–315.
- Baker, T. S., Caspar, D. L. & Murakami, W. T. (1983). Polyoma virus ‘hexamer’ tubes consist of paired pentamers. *Nature* **303**, 446–448.
- Bakre, A., Mitchell, P., Coleman, J. K., Jones, L. P., Saavedra, G., Teng, M., Tompkins, S. M. & Tripp, R. A. (2012). Respiratory syncytial virus modifies microRNAs regulating host genes that affect virus replication. *J Gen Virol* **93**, 2346–56.
- Barczyk, M., Carracedo, S. & Gullberg, D. (2010). Integrins. *Cell Tissue Res* **339**, 269–280.
- Barouch, D. H. & Harrison, S. C. (1994). Interactions among the major and minor coat proteins of polyomavirus. *J Virol* **68**, 3982–9.
- Barrett, S. D., Bridges, A. J., Dudley, D. T., Saltiel, A. R., Fergus, J. H., Flamme, C. M., Delaney, A. M., Kaufman, M., LePage, S. & other authors. (2008). The discovery of the benzhydroxamate MEK inhibitors CI-1040 and PD 0325901. *Bioorg Med Chem Lett* **18**, 6501–6504.
- Barton, G. M., Kagan, J. C. & Medzhitov, R. (2006). Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. *Nat Immunol* **7**, 49–56.
- Bauer, P. H., Cui, C., Liu, W. R., Stehle, T., Harrison, S. C., DeCaprio, J. A. & Benjamin, T. L. (1999). Discrimination between sialic acid-containing receptors and pseudoreceptors regulates polyomavirus spread in the mouse. *J Virol* **73**, 5826–32.
- Bauer, S., Kirschning, C. J., Häcker, H., Redecke, V., Hausmann, S., Akira, S., Wagner, H. & Lipford, G. B. (2001). Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 9237–42.
- Beard, P., Acheson, N. H. & Maxwell, I. H. (1975). Strand-specific transcription of polyoma virus DNA-early in productive infection and in transformed cells. *J Virol* **17**, 20–6.
- Benjamin, T. L. (2001). Polyoma Virus: Old Findings and New Challenges. *Virology* **289**, 167–173.
- Bird, G., O'Donnell, M., Moroianu, J. & Garcea, R. L. (2008). Possible role for cellular karyopherins in regulating polyomavirus and papillomavirus capsid assembly. *J Virol* **82**, 9848–57.



- Borchert, S., Czech-Sioli, M., Neumann, F., Schmidt, C., Wimmer, P., Dobner, T., Grundhoff, A. & Fischer, N. (2014).** High-affinity Rb binding, p53 inhibition, subcellular localization, and transformation by wild-type or tumor-derived shortened Merkel cell polyomavirus large T antigens. *J Virol* **88**, 3144–60.
- Brinkmann, M. M., Spooner, E., Hoebe, K., Beutler, B., Ploegh, H. L. & Kim, Y.-M. (2007).** The interaction between the ER membrane protein UNC93B and TLR3, 7, and 9 is crucial for TLR signaling. *J Cell Biol* **177**, 265–75.
- Buck, C. B., Van Doorslaer, K., Peretti, A., Geoghegan, E. M., Tisza, M. J., An, P., Katz, J. P., Pipas, J. M., McBride, A. A. & other authors. (2016).** The Ancient Evolutionary History of Polyomaviruses. *PLOS Pathog* **12** (D. A. Galloway, Ed.).
- Buch, M. H. C., Liaci, A. M., O'Hara, S. D., Garcea, R. L., Neu, U. & Stehle, T. (2015).** Structural and Functional Analysis of Murine Polyomavirus Capsid Proteins Establish the Determinants of Ligand Recognition and Pathogenicity. *PLoS Pathog* **11**.
- Burzyn, D., Rassa, J. C., Kim, D., Nepomnaschy, I., Ross, S. R. & Piazzon, I. (2004).** Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by a retrovirus. *J Virol* **78**, 576–84.
- Butel, J. S. & Lednický, J. A. (1999).** Cell and molecular biology of simian virus 40: Implications for human infections and disease. *J Natl Cancer Inst* **91**, 119–134.
- von Buttlar, H., Siegemund, S., Büttner, M. & Alber, G. (2014).** Identification of Toll-like receptor 9 as parapoxvirus ovis-sensing receptor in plasmacytoid dendritic cells. *PLoS One* **9**, e106188.
- Calvignac-Spencer, S., Feltkamp, M. C. W., Daugherty, M. D., Moens, U., Ramqvist, T., John, R. & Ehlers, B. (2016).** A taxonomy update for the family Polyomaviridae. *Arch Virol* **1–12**.
- Carbone, M., Reale, A., Di Sauro, A., Sthandier, O., Garcia, M.-I., Maione, R., Caiafa, P. & Amati, P. (2006).** PARP-1 interaction with VP1 capsid protein regulates polyomavirus early gene expression. *J Mol Biol* **363**, 773–85.
- Carmichael, G. G., Schaffhausen, B. S., Dorsky, D. I., Oliver, D. B. & Benjamin, T. L. (1982).** Carboxy terminus of polyoma middle-sized tumor antigen is required for attachment to membranes, associated protein kinase activities, and cell transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 3579–83.
- Caruso, M., Belloni, L., Sthandier, O., Amati, P. & Garcia, M.-I. (2003).** Alpha4beta1 integrin acts as a cell receptor for murine polyomavirus at the postattachment level. *J Virol* **77**, 3913–21.
- Caruso, M., Busanello, A., Sthandier, O., Cavaldesi, M., Gentile, M., Garcia, M. I. & Amati, P. (2007).** Mutation in the VP1-LDV motif of the murine polyomavirus affects viral infectivity and conditions virus tissue tropism in vivo. *J Mol Biol* **367**, 54–64.
- Coats, S. R., Pham, T.-T. T., Bainbridge, B. W., Reife, R. A. & Darveau, R. P. (2005).** MD-2 mediates the ability of tetra-acylated and penta-acylated lipopolysaccharides to antagonize Escherichia coli lipopolysaccharide at the TLR4 signaling complex. *J Immunol* **175**, 4490–8.
- Courtneidge, S. a. (1985).** Activation of the pp60c-src kinase by middle T antigen binding or by dephosphorylation. *EMBO J* **4**, 1471–7.
- Courtneidge, S. A. & Smith, A. E. (1983).** Polyoma virus transforming protein associates with the product of the c-src cellular gene. *Nature* **303**, 435–439.
- Cowie, A. & Kamen, R. (1984).** Multiple binding sites for polyomavirus large T antigen within regulatory sequences of polyomavirus DNA. *J Virol* **52**, 750–60.
- Cripe, T. P., Delos, S. E., Estes, P. A. & Garcea, R. L. (1995).** In vivo and in vitro association of hsc70 with polyomavirus capsid proteins. *J Virol* **69**, 7807–13.
- Denner, J. (2015).** Treatment of Ebola virus infections with inhibitors of TLR4. *Med Hypotheses* **85**, 253–7.
- Dilworth, S. M. & Griffin, B. E. (1982).** Monoclonal antibodies against polyoma virus tumor antigens. *Proc Natl Acad Sci* **79**, 1059–1063.
- Dilworth, S. M., Brewster, C. E., Jones, M. D., Lanfranccone, L., Pelicci, G. & Pelicci, P. G. (1994).** Transformation by polyoma virus middle T-antigen involves the binding and tyrosine phosphorylation of Shc. *Nature* **367**, 87–90.
- Dudley, D. T., Pang, L., Decker, S. J., Bridges, A. J. & Saltiel, A. R. (1995).** A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 7686–9.
- Eferl, R. & Wagner, E. F. (2003).** AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* **3**, 859–68.

- Ewald, S. E., Lee, B. L., Lau, L., Wickliffe, K. E., Shi, G.-P., Chapman, H. A. & Barton, G. M. (2008). The ectodomain of Toll-like receptor 9 is cleaved to generate a functional receptor. *Nature* **456**, 658–62.
- Feng, H., Shuda, M., Chang, Y. & Moore, P. S. (2008). Clonal Integration of a Polyomavirus in Human Merkel Cell Carcinoma. *Science* (80-) **150**, 1096–1100.
- Fiola, S., Gosselin, D., Takada, K. & Gosselin, J. (2010). TLR9 contributes to the recognition of EBV by primary monocytes and plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* **185**, 3620–31.
- Fitzgerald, K. A., Rowe, D. C., Barnes, B. J., Caffrey, D. R., Visintin, A., Latz, E., Monks, B., Pitha, P. M. & Golenbock, D. T. (2003). LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. *J Exp Med* **198**, 1043–55.
- Flaherty, S. F., Golenbock, D. T., Milham, F. H. & Ingalls, R. R. (1997). CD11/CD18 leukocyte integrins: new signaling receptors for bacterial endotoxin. *J Surg Res* **73**, 85–9.
- Fluck, M. M. & Schaffhausen, B. S. (2009). Lessons in signaling and tumorigenesis from polyomavirus middle T antigen. *Microbiol Mol Biol Rev* **73**, 542–63, Table of Contents.
- Forstová, J., Krauzewicz, N., Wallace, S., Street, A. J., Dilworth, S. M., Beard, S. & Griffin, B. E. (1993). Cooperation of structural proteins during late events in the life cycle of polyomavirus. *J Virol* **67**, 1405–13.
- Frankel, A. E., Eskiocak, U., Gill, J. G., Yuan, S., Ramesh, V., Froehlich, T. W., Ahn, C. & Morrison, S. J. (2017). Digoxin Plus Trametinib Therapy Achieves Disease Control in BRAF Wild-Type Metastatic Melanoma Patients. *Neoplasia* **19**, 255–260.
- Freund, R., Bauer, P. H., Crissman, H. A., Bradbury, E. M. & Benjamin, T. L. (1994). Host range and cell cycle activation properties of polyomavirus large T-antigen mutants defective in pRB binding. *J Virol* **68**, 7227–34.
- Frost, J. A., Alberts, A. S., Sontag, E., Guan, K., Mumby, M. C. & Feramisco, J. R. (1994). Simian virus 40 small t antigen cooperates with mitogen-activated kinases to stimulate AP-1 activity. *Mol Cell Biol* **14**, 6244–52.
- Gardner, S. D., Field, A. M., Coleman, D. V. & Hulme, B. (1971). New Human Papovavirus (B.K.) Isolated From Urine After Renal Transplantation. *Lancet* **297**, 1253–1257.
- Gianni, T. & Campadelli-Fiume, G. (2014). The Epithelial  $\alpha\beta$ 3-Integrin Boosts the MYD88-Dependent TLR2 Signaling in Response to Viral and Bacterial Components. *PLoS Pathog* **10**, e1004477 (R. M. Sandri-Goldin, Ed.).
- Gilbert, J. M. & Benjamin, T. L. (2000). Early steps of polyomavirus entry into cells. *J Virol* **74**, 8582–8.
- Gilbert, J. & Benjamin, T. (2004). Uptake pathway of polyomavirus via ganglioside GD1a. *J Virol* **78**, 12259–67.
- Gilbert, J., Ou, W., Silver, J. & Benjamin, T. (2006). Downregulation of protein disulfide isomerase inhibits infection by the mouse polyomavirus. *J Virol* **80**.
- Gilbert, J. M., Goldberg, I. G. & Benjamin, T. L. (2003). Cell penetration and trafficking of polyomavirus. *J Virol* **77**, 2615–22.
- Gillock, E. T., Rottinghaus, S., Chang, D., Cai, X., Smiley, S. A., An, K. & Consigli, R. A. (1997). Polyomavirus major capsid protein VP1 is capable of packaging cellular DNA when expressed in the baculovirus system. *J Virol* **71**, 2857–65.
- Glenn, G. M. & Eckhart, W. (1990). Transcriptional regulation of early-response genes during polyomavirus infection. *J Virol* **64**, 2193–201.
- Gohda, J., Matsumura, T. & Inoue, J. (2004). Cutting edge: TNFR-associated factor (TRAF) 6 is essential for MyD88-dependent pathway but not toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor-inducing IFN-beta (TRIF)-dependent pathway in TLR signaling. *J Immunol* **173**, 2913–7.
- Golenbock, D. T., Hampton, R. Y., Qureshi, N., Takayama, K. & Raetz, C. R. (1991). Lipid A-like molecules that antagonize the effects of endotoxins on human monocytes. *J Biol Chem* **266**, 19490–8.
- Griffith, G. R. & Consigli, R. A. (1984). Isolation and characterization of monopinocytotic vesicles containing polyomavirus from the cytoplasm of infected mouse kidney cells. *J Virol* **50**, 77–85.
- Griffith, J. P., Griffith, D. L., Rayment, I., Murakami, W. T. & Caspar, D. L. (1992). Inside polyomavirus at 25-A resolution. *Nature* **355**, 652–4.
- Gross, L. (1953). A Filterable Agent, Recovered from Ak Leukemic Extracts, Causing Salivary Gland

- Carcinomas in C3H Mice. *Exp Biol Med* **83**, 414–421.
- Hasan, U. A., Trinchieri, G. & Vlach, J. (2005).** Toll-like receptor signaling stimulates cell cycle entry and progression in fibroblasts. *J Biol Chem* **280**, 20620–7.
- Hasan, U. A., Caux, C., Perrot, I., Doffin, A.-C., Menetrier-Caux, C., Trinchieri, G., Tommasino, M. & Vlach, J. (2007).** Cell proliferation and survival induced by Toll-like receptors is antagonized by type I IFNs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 8047–52.
- Haynes, L. M., Moore, D. D., Kurt-Jones, E. A., Finberg, R. W., Anderson, L. J. & Tripp, R. A. (2001).** Involvement of toll-like receptor 4 in innate immunity to respiratory syncytial virus. *J Virol* **75**, 10730–7.
- Heit, A., Huster, K. M., Schmitz, F., Schiemann, M., Busch, D. H. & Wagner, H. (2004).** CpG-DNA aided cross-priming by cross-presenting B cells. *J Immunol* **172**, 1501–7.
- Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H. & other authors. (2000).** A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* **408**, 740–5.
- Hoelzer, K., Shackelton, L. A. & Parrish, C. R. (2008).** Presence and role of cytosine methylation in DNA viruses of animals. *Nucleic Acids Res* **36**, 2825–37.
- Honda, K., Yanai, H., Negishi, H., Asagiri, M., Sato, M., Mizutani, T., Shimada, N., Ohba, Y., Takaoka, A. & other authors. (2005).** IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature* **434**, 772–7.
- Horníková, L., Fraiberk, M., Man, P., Janovec, V. & Forstová, J. (2017).** VP1, the major capsid protein of the mouse polyomavirus, binds microtubules, promotes their acetylation and blocks the host cell cycle. *FEBS J* **284**, 301–323.
- Hornung, V., Rothenfusser, S., Britsch, S., Krug, A., Jahrsdörfer, B., Giese, T., Endres, S. & Hartmann, G. (2002).** Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol* **168**, 4531–7.
- Houben, R., Shuda, M., Weinkam, R., Schrama, D., Feng, H., Chang, Y., Moore, P. S. & Becker, J. C. (2010).** Merkel Cell Polyomavirus-Infected Merkel Cell Carcinoma Cells Require Expression of Viral T Antigens. *J Virol* **84**, 7064–7072.
- Huang, Y., Zhao, L.-L., Feng, J.-L., Zhu, H.-X., Huang, X., Ren, Q. & Wang, W. (2015).** A novel integrin function in innate immunity from Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*). *Dev Comp Immunol* **52**, 155–65.
- Huang, Y. & Carmichael, G. G. (2009).** RNA processing in the polyoma virus life cycle. *Front Biosci (Landmark Ed)* **14**, 4968–77.
- Huerfano, S., Zila, V., Boura, E., Spanielová, H., Stokrová, J. & Forstová, J. (2010).** Minor capsid proteins of mouse polyomavirus are inducers of apoptosis when produced individually but are only moderate contributors to cell death during the late phase of viral infection. *FEBS J* **277**, 1270–83.
- Huérfano, S., Ryabchenko, B., Španielová, H. & Forstová, J. (2017).** Hydrophobic domains of mouse polyomavirus minor capsid proteins promote membrane association and virus exit from the ER. *FEBS J* **284**, 883–902.
- Husebye, H., Halaas, Ø., Stenmark, H., Tunheim, G., Sandanger, Ø., Bogen, B., Brech, A., Latz, E. & Espevik, T. (2006).** Endocytic pathways regulate Toll-like receptor 4 signaling and link innate and adaptive immunity. *EMBO J* **25**, 683–92.
- Chang, L. & Karin, M. (2001).** Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* **410**, 37–40.
- Chen, L. & Fluck, M. (2001).** Kinetic analysis of the steps of the polyomavirus lytic cycle. *J Virol* **75**, 8368–79.
- Chen, L., Wang, X. & Fluck, M. M. (2006).** Independent contributions of polyomavirus middle T and small T to the regulation of early and late gene expression and DNA replication. *J Virol* **80**, 7295–307.
- Chen, X. S., Stehle, T. & Harrison, S. C. (1998).** Interaction of polyomavirus internal protein VP2 with the major capsid protein VP1 and implications for participation of VP2 in viral entry. *EMBO J* **17**, 3233–40.
- Chen, Y., Freund, R., Listerud, M., Wang, Z. & Talmage, D. A. (1999).** Retinoic acid inhibits transformation by preventing phosphatidylinositol 3-kinase dependent activation of the c-fos promoter. *Oncogene* **18**, 139–48.

- Cheng, J., Rozenblatt-Rosen, O., Paulson, K. G., Nghiem, P. & Decaprio, J. a. (2013). Merkel Cell Polyomavirus Large T Antigen has Growth Promoting and Inhibitory Activities. *J Virol* **87**, 6118–6126.
- Chromy, L. R., Pipas, J. M. & Garcea, R. L. (2003). Chaperone-mediated in vitro assembly of Polyomavirus capsids. *Proc Natl Acad Sci* **100**, 10477–10482.
- Chung, S.-W., Lee, J.-H., Choi, K.-H., Park, Y.-C., Eo, S.-K., Rhim, B.-Y. & Kim, K. (2009). Extracellular heat shock protein 90 induces interleukin-8 in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* **378**, 444–9.
- Ii, M., Matsunaga, N., Hazeki, K., Nakamura, K., Takashima, K., Seya, T., Hazeki, O., Kitazaki, T. & Iizawa, Y. (2006). A novel cyclohexene derivative, ethyl (6R)-6-[N-(2-Chloro-4-fluorophenyl)sulfamoyl]cyclohex-1-ene-1-carboxylate (TAK-242), selectively inhibits toll-like receptor 4-mediated cytokine production through suppression of intracellular signaling. *Mol Pharmacol* **69**, 1288–95.
- Ito, Y., Brocklehurst, J. R. & Dulbecco, R. (1977). Virus-specific proteins in the plasma membrane of cells lytically infected or transformed by pol-oma virus. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**, 4666–70.
- Iversen, A.-C., Steinkjer, B., Nilsen, N., Bohnhorst, J., Moen, S. H., Vik, R., Stephens, P., Thomas, D. W., Benedict, C. A. & Espevik, T. (2009). A Proviral Role for CpG in Cytomegalovirus Infection. *J Immunol* **182**, 5672–5681.
- Jarvis, B. W., Lichenstein, H. & Qureshi, N. (1997). Diphosphoryl lipid A from *Rhodobacter sphaeroides* inhibits complexes that form in vitro between lipopolysaccharide (LPS)-binding protein, soluble CD14, and spectrally pure LPS. *Infect Immun* **65**, 3011–6.
- Jerala, R. (2007). Structural biology of the LPS recognition. *Int J Med Microbiol* **297**, 353–63.
- Jia, Z., Zhang, T., Jiang, S., Wang, M., Cheng, Q., Sun, M., Wang, L. & Song, L. (2015). An integrin from oyster *Crassostrea gigas* mediates the phagocytosis toward *Vibrio splendidus* through LPS binding activity. *Dev Comp Immunol* **53**, 253–64.
- Jude, B. A., Pobezinskaya, Y., Bishop, J., Parke, S., Medzhitov, R. M., Chervonsky, A. V & Golovkina, T. V. (2003). Subversion of the innate immune system by a retrovirus. *Nat Immunol* **4**, 573–8.
- Kagan, J. C. & Medzhitov, R. (2006). Phosphoinositide-mediated adaptor recruitment controls Toll-like receptor signaling. *Cell* **125**, 943–55.
- Kagan, J. C., Su, T., Horng, T., Chow, A., Akira, S. & Medzhitov, R. (2008). TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta. *Nat Immunol* **9**, 361–8.
- Kane, M., Case, L. K., Kopaskie, K., Kozlova, A., MacDearmid, C., Chervonsky, A. V & Golovkina, T. V. (2011). Successful transmission of a retrovirus depends on the commensal microbiota. *Science* **334**, 245–9.
- Kaplan, D. R., Whitman, M., Schaffhausen, B., Raptis, L., Garcea, R. L., Pallas, D., Roberts, T. M. & Cantley, L. (1986). Phosphatidylinositol metabolism and polyoma-mediated transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 3624–8.
- Kawagoe, T., Sato, S., Matsushita, K., Kato, H., Matsui, K., Kumagai, Y., Saitoh, T., Kawai, T., Takeuchi, O. & Akira, S. (2008). Sequential control of Toll-like receptor-dependent responses by IRAK1 and IRAK2. *Nat Immunol* **9**, 684–91.
- Kawai, T., Adachi, O., Ogawa, T., Takeda, K. & Akira, S. (1999). Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* **11**, 115–22.
- Kawai, T., Takeuchi, O., Fujita, T., Inoue, J., Mühlradt, P. F., Sato, S., Hoshino, K. & Akira, S. (2001). Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes. *J Immunol* **167**, 5887–94.
- Kawai, T. & Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* **11**, 373–84.
- Kawai, T., Sato, S., Ishii, K. J., Coban, C., Hemmi, H., Yamamoto, M., Terai, K., Matsuda, M., Inoue, J. & other authors. (2004). Interferon-alpha induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6. *Nat Immunol* **5**, 1061–8.
- Kendall, J. C., Li, X. H., Galli, S. J. & Gordon, J. R. (1997). Promotion of mouse fibroblast proliferation by IgE-dependent activation of mouse mast cells: role for mast cell tumor necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta 1. *J Allergy Clin Immunol* **99**, 113–23.

- Kim, Y.-M., Brinkmann, M. M., Paquet, M.-E. & Ploegh, H. L. (2008).** UNC93B1 delivers nucleotide-sensing toll-like receptors to endolysosomes. *Nature* **452**, 234–8.
- Knipe, D. M. & Howley, P. M. (2007).** *Fields virology*, 5th edn. Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins.
- Kobayashi, M., Saitoh, S. -i., Tanimura, N., Takahashi, K., Kawasaki, K., Nishijima, M., Fujimoto, Y., Fukase, K., Akashi-Takamura, S. & Miyake, K. (2006).** Regulatory Roles for MD-2 and TLR4 in Ligand-Induced Receptor Clustering. *J Immunol* **176**, 6211–6218.
- Krauzewicz, N., Streuli, C. H., Stuart-Smith, N., Jones, M. D., Wallace, S. & Griffin, B. E. (1990).** Myristylated polyomavirus VP2: role in the life cycle of the virus. *J Virol* **64**, 4414–20.
- Krieg, A. M. (1999).** Mechanisms and applications of immune stimulatory CpG oligodeoxynucleotides. *Biochim Biophys Acta* **1489**, 107–16.
- Krug, A., Towarowski, A., Britsch, S., Rothenfusser, S., Hornung, V., Bals, R., Giese, T., Engelmann, H., Endres, S. & other authors. (2001).** Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12. *Eur J Immunol* **31**, 3026–37.
- Kumari, N., Dwarakanath, B. S., Das, A. & Bhatt, A. N. (2016).** Role of interleukin-6 in cancer progression and therapeutic resistance. *Tumour Biol* **37**, 11553–11572.
- Kurt-Jones, E. A., Popova, L., Kwinn, L., Haynes, L. M., Jones, L. P., Tripp, R. A., Walsh, E. E., Freeman, M. W., Golenbock, D. T. & other authors. (2000).** Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat Immunol* **1**, 398–401.
- Kurt-Jones, E. A., Sandor, F., Ortiz, Y., Bowen, G. N., Counter, S. L., Wang, T. C. & Finberg, R. W. (2004).** Use of murine embryonic fibroblasts to define Toll-like receptor activation and specificity. *J Endotoxin Res* **10**, 419–24.
- Lamping, N., Hoess, A., Yu, B., Park, T. C., Kirschning, C. J., Pfeil, D., Reuter, D., Wright, S. D., Herrmann, F. & Schumann, R. R. (1996).** Effects of site-directed mutagenesis of basic residues (Arg 94, Lys 95, Lys 99) of lipopolysaccharide (LPS)-binding protein on binding and transfer of LPS and subsequent immune cell activation. *J Immunol* **157**, 4648–56.
- Latz, E., Schoenemeyer, A., Visintin, A., Fitzgerald, K. A., Monks, B. G., Knetter, C. F., Lien, E., Nilsen, N. J., Espevik, T. & Golenbock, D. T. (2004).** TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat Immunol* **5**, 190–8.
- Liddington, R. C., Yan, Y., Moulai, J., Sahli, R., Benjamin, T. L. & Harrison, S. C. (1991).** Structure of simian virus 40 at 3.8-Å resolution. *Nature* **354**, 278–84.
- Liebl, D., Difato, F., Horníková, L., Mannová, P., Stokrová, J. & Forstová, J. (2006).** Mouse polyomavirus enters early endosomes, requires their acidic pH for productive infection, and meets transferrin cargo in Rab11-positive endosomes. *J Virol* **80**, 4610–22.
- Lilley, B. N., Gilbert, J. M., Ploegh, H. L. & Benjamin, T. L. (2006).** Murine polyomavirus requires the endoplasmic reticulum protein Derlin-2 to initiate infection. *J Virol* **80**, 8739–44.
- Lipin, D. I., Chuan, Y. P., Lua, L. H. L. & Middelberg, A. P. J. (2008).** Encapsulation of DNA and non-viral protein changes the structure of murine polyomavirus virus-like particles. *Arch Virol* **153**, 2027–39.
- Liu, S., Gao, L., Wang, X. & Xing, Y. (2015).** Respiratory syncytial virus infection inhibits TLR4 signaling via up-regulation of miR-26b. *Cell Biol Int* **39**, 1376–83.
- Liu, W., Yang, R., Payne, A. S., Schowalter, R. M., Spurgeon, M. E., Lambert, P. F., Xu, X., Buck, C. B. & You, J. (2016).** Identifying the Target Cells and Mechanisms of Merkel Cell Polyomavirus Infection. *Cell Host Microbe* **19**, 775–87.
- Luganini, A., Caposio, P., Landolfo, S. & Griboudo, G. (2008).** Phosphorothioate-modified oligodeoxynucleotides inhibit human cytomegalovirus replication by blocking virus entry. *Antimicrob Agents Chemother* **52**, 1111–20.
- Lund, J., Sato, A., Akira, S., Medzhitov, R. & Iwasaki, A. (2003).** Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* **198**, 513–20.
- Magnuson, B., Rainey, E. K., Benjamin, T., Baryshev, M., Mkrtchian, S. & Tsai, B. (2005).** ERp29 triggers a conformational change in polyomavirus to stimulate membrane binding. *Mol Cell* **20**, 289–300.
- Mannová, P. & Forstová, J. (2003).** Mouse polyomavirus utilizes recycling endosomes for a traffic pathway independent of COPI vesicle transport. *J Virol* **77**, 1672–81.

- Marconcini, R., Galli, L., Antonuzzo, A., Bursi, S., Roncella, C., Fontanini, G., Sensi, E. & Falcone, A. (2017).** Metastatic BRAF K601E-mutated melanoma reaches complete response to MEK inhibitor trametinib administered for over 36 months. *Exp Hematol Oncol* **6**, 6.
- Martin, M. E., Piette, J., Yaniv, M., Tang, W. J. & Folk, W. R. (1988).** Activation of the polyomavirus enhancer by a murine activator protein 1 (AP1) homolog and two contiguous proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 5839–43.
- Martinson, J. A., Tenorio, A. R., Montoya, C. J., Al-Harthi, L., Gichinga, C. N., Krieg, A. M., Baum, L. L. & Landay, A. L. (2007).** Impact of class A, B and C CpG-oligodeoxynucleotides on in vitro activation of innate immune cells in human immunodeficiency virus-1 infected individuals. *Immunology* **120**, 526–35.
- Matsumoto, F., Saitoh, S.-I., Fukui, R., Kobayashi, T., Tanimura, N., Konno, K., Kusumoto, Y., Akashi-Takamura, S. & Miyake, K. (2008).** Cathepsins are required for Toll-like receptor 9 responses. *Biochem Biophys Res Commun* **367**, 693–9.
- Matsunaga, N., Tsuchimori, N., Matsumoto, T. & Ii, M. (2011).** TAK-242 (resatorvid), a small-molecule inhibitor of Toll-like receptor (TLR) 4 signaling, binds selectively to TLR4 and interferes with interactions between TLR4 and its adaptor molecules. *Mol Pharmacol* **79**, 34–41.
- McNab, F., Mayer-Barber, K., Sher, A., Wack, A. & O'Garra, A. (2015).** Type I interferons in infectious disease. *Nat Rev Immunol* **15**, 87–103.
- Meili, R., Cron, P., Hemmings, B. A. & Ballmer-Hofer, K. (1998).** Protein kinase B/Akt is activated by polyomavirus middle-T antigen via a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanism. *Oncogene* **16**, 903–7.
- Mermod, N., Williams, T. J. & Tjian, R. (1988).** Enhancer binding factors AP-4 and AP-1 act in concert to activate SV40 late transcription in vitro. *Nature* **332**, 557–61.
- Michel, M. R., Hirt, B. & Weil, R. (1967).** Mouse cellular DNA enclosed in polyoma viral capsids (pseudovirions). *Proc Natl Acad Sci U S A* **58**, 1381–1388.
- Morávková, A. (2001):** Příprava protilátek proti hlavnímu strukturnímu proteinu myšího polyomaviru. Diplomová práce, Univerzita Karlova, Praha.
- Mueller, C. R., Muller, W. J. & Hassell, J. A. (1988).** The polyomavirus enhancer comprises multiple functional elements. *J Virol* **62**, 1667–78.
- Mullane, K. P., Ratnofsky, M., Culleré, X. & Schaffhausen, B. (1998).** Signaling from polyomavirus middle T and small T defines different roles for protein phosphatase 2A. *Mol Cell Biol* **18**, 7556–64.
- Muroi, M., Ohnishi, T. & Tanamoto, K.-I. (2002).** Regions of the mouse CD14 molecule required for toll-like receptor 2- and 4-mediated activation of NF-kappa B. *J Biol Chem* **277**, 42372–9.
- Muzio, M., Ni, J., Feng, P. & Dixit, V. M. (1997).** IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling. *Science* **278**, 1612–5.
- Nemethova, M., Smutny, M. & Wintersberger, E. (2004).** Transactivation of E2F-regulated genes by polyomavirus large T antigen: evidence for a two-step mechanism. *Mol Cell Biol* **24**, 10986–94.
- O'Hara, S. D. & Garcea, R. L. (2016).** Murine Polyomavirus Cell Surface Receptors Activate Distinct Signaling Pathways Required for Infection. *MBio* **7**.
- Ogris, E., Mudrak, I., Mak, E., Gibson, D. & Pallas, D. C. (1999).** Catalytically inactive protein phosphatase 2A can bind to polyomavirus middle tumor antigen and support complex formation with pp60(c-src). *J Virol* **73**, 7390–8.
- Okumura, A., Pitha, P. M., Yoshimura, A. & Harty, R. N. (2010).** Interaction between Ebola virus glycoprotein and host toll-like receptor 4 leads to induction of proinflammatory cytokines and SOCS1. *J Virol* **84**, 27–33.
- Padgett, B. L., Zurhein, G. M., Walker, D. L., Eckroade, R. J. & Dessel, B. H. (1971).** Cultivation of Papova-Like Virus from Human Brain with Progressive Multifocal Leucoencephalopathy. *Lancet* **297**, 1257–1260.
- Pahl, J. H. W., Verhoeven, D. H. J., Kwappenberg, K. M. C., Vellinga, J., Lankester, A. C., van Tol, M. J. D. & Schilham, M. W. (2012).** Adenovirus type 35, but not type 5, stimulates NK cell activation via plasmacytoid dendritic cells and TLR9 signaling. *Mol Immunol* **51**, 91–100.
- Palková, Z., Spanielová, H., Gottifredi, V., Hollanderová, D., Forstová, J. & Amati, P. (2000).** The polyomavirus major capsid protein VP1 interacts with the nuclear matrix regulatory protein YY1. *FEBS Lett* **467**, 359–64.

- Pallas, D. C., Shahrik, L. K., Martin, B. L., Jaspers, S., Miller, T. B., Brautigan, D. L. & Roberts, T. M. (1990).** Polyoma small and middle T antigens and SV40 small t antigen form stable complexes with protein phosphatase 2A. *Cell* **60**, 167–76.
- Park, B. S., Song, D. H., Kim, H. M., Choi, B.-S., Lee, H. & Lee, J.-O. (2009).** The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature* **458**, 1191–5.
- Park, B., Brinkmann, M. M., Spooner, E., Lee, C. C., Kim, Y.-M. & Ploegh, H. L. (2008).** Proteolytic cleavage in an endolysosomal compartment is required for activation of Toll-like receptor 9. *Nat Immunol* **9**, 1407–14.
- Pastrana, D. V., Tolstov, Y. L., Becker, J. C., Moore, P. S., Chang, Y. & Buck, C. B. (2009).** Quantitation of Human Seroresponsiveness to Merkel Cell Polyomavirus. *PLoS Pathog* **5** (R. L. Garcea, Ed.).
- Pease, L. F., Lipin, D. I., Tsai, D.-H., Zachariah, M. R., Lua, L. H. L., Tarlov, M. J. & Middelberg, A. P. J. (2009).** Quantitative characterization of virus-like particles by asymmetrical flow field flow fractionation, electrospray differential mobility analysis, and transmission electron microscopy. *Biotechnol Bioeng* **102**, 845–55.
- Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M. Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M. & other authors. (1998).** Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* **282**, 2085–8.
- Prohinar, P., Re, F., Widstrom, R., Zhang, D., Teghanemt, A., Weiss, J. P. & Gioannini, T. L. (2007).** Specific high affinity interactions of monomeric endotoxin.protein complexes with Toll-like receptor 4 ectodomain. *J Biol Chem* **282**, 1010–7.
- Qian, M. & Tsai, B. (2010).** Lipids and proteins act in opposing manners to regulate polyomavirus infection. *J Virol* **84**, 9840–52.
- Qian, M., Cai, D., Verhey, K. J. & Tsai, B. (2009).** A lipid receptor sorts polyomavirus from the endolysosome to the endoplasmic reticulum to cause infection. *PLoS Pathog* **5**.
- Querbes, W., Benmerah, A., Tosoni, D., Di Fiore, P. P. & Atwood, W. J. (2004).** A JC virus-induced signal is required for infection of glial cells by a clathrin- and eps15-dependent pathway. *J Virol* **78**, 250–6.
- Rakoff-Nahoum, S., Paglino, J., Eslami-Varzaneh, F., Edberg, S. & Medzhitov, R. (2004).** Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* **118**, 229–41.
- Rasmussen, S. B., Sørensen, L. N., Malmgaard, L., Ank, N., Baines, J. D., Chen, Z. J. & Paludan, S. R. (2007).** Type I interferon production during herpes simplex virus infection is controlled by cell-type-specific viral recognition through Toll-like receptor 9, the mitochondrial antiviral signaling protein pathway, and novel recognition systems. *J Virol* **81**, 13315–24.
- Rassa, J. C., Meyers, J. L., Zhang, Y., Kudaravalli, R. & Ross, S. R. (2002).** Murine retroviruses activate B cells via interaction with toll-like receptor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 2281–6.
- Ravichandran, V., Jensen, P. N. & Major, E. O. (2007).** MEK1/2 Inhibitors Block Basal and Transforming Growth Factor 1-Stimulated JC Virus Multiplication. *J Virol* **81**, 6412–6418.
- Rayment, I., Baker, T. S., Caspar, D. L. & Murakami, W. T. (1982).** Polyoma virus capsid structure at 22.5 Å resolution. *Nature* **295**, 110–5.
- Reynolds, J. M., Pappu, B. P., Peng, J., Martinez, G. J., Zhang, Y., Chung, Y., Ma, L., Yang, X. O., Nurieva, R. I. & other authors. (2010).** Toll-like receptor 2 signaling in CD4(+) T lymphocytes promotes T helper 17 responses and regulates the pathogenesis of autoimmune disease. *Immunity* **32**, 692–702.
- Richterová, Z., Liebl, D., Horák, M., Palková, Z., Stokrová, J., Hozák, P., Korb, J. & Forstová, J. (2001).** Caveolae are involved in the trafficking of mouse polyomavirus virions and artificial VP1 pseudocapsids toward cell nuclei. *J Virol* **75**, 10880–91.
- Rodriguez-Viciano, P., Collins, C. & Fried, M. (2006).** Polyoma and SV40 proteins differentially regulate PP2A to activate distinct cellular signaling pathways involved in growth control. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 19290–5.
- Sachs, L. & Winocour, E. (1959).** Formation of Different Cell–Virus Relationships in Tumour Cells Induced by Polyoma. *Nature* **184**, 1702–1704.
- Salunke, D. M., Caspar, D. L. & Garcea, R. L. (1986).** Self-assembly of purified polyomavirus capsid protein VP1. *Cell* **46**, 895–904.

- Salunke, D. M., Caspar, D. L. & Garcea, R. L. (1989). Polymorphism in the assembly of polyomavirus capsid protein VP1. *Biophys J* **56**, 887–900.
- Samuelsson, C., Hausmann, J., Lauterbach, H., Schmidt, M., Akira, S., Wagner, H., Chaplin, P., Suter, M., O’Keeffe, M. & Hochrein, H. (2008). Survival of lethal poxvirus infection in mice depends on TLR9, and therapeutic vaccination provides protection. *J Clin Invest* **118**, 1776–84.
- Sato, S., Sanjo, H., Takeda, K., Ninomiya-Tsuji, J., Yamamoto, M., Kawai, T., Matsumoto, K., Takeuchi, O. & Akira, S. (2005). Essential function for the kinase TAK1 in innate and adaptive immune responses. *Nat Immunol* **6**, 1087–95.
- Seamone, M. E., Wang, W., Acott, P., Beck, P. L., Tibbles, L. A. & Muruve, D. A. (2010). MAP kinase activation increases BK polyomavirus replication and facilitates viral propagation in vitro. *J Virol Methods* **170**, 21–9.
- Sepulveda, F. E., Maschalidi, S., Colisson, R., Heslop, L., Ghirelli, C., Sakka, E., Lennon-Duménil, A.-M., Amigorena, S., Cabanie, L. & Manoury, B. (2009). Critical role for asparagine endopeptidase in endocytic Toll-like receptor signaling in dendritic cells. *Immunity* **31**, 737–48.
- Shimazu, R., Akashi, S., Ogata, H., Nagai, Y., Fukudome, K., Miyake, K. & Kimoto, M. (1999). MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med* **189**, 1777–82.
- Schmidt, K., Keller, M., Bader, B. L., Korytář, T., Finke, S., Ziegler, U. & Groschup, M. H. (2013). Integrins modulate the infection efficiency of West Nile virus into cells. *J Gen Virol* **94**, 1723–33.
- Schnare, M., Barton, G. M., Holt, A. C., Takeda, K., Akira, S. & Medzhitov, R. (2001). Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nat Immunol* **2**, 947–50.
- Schönthal, A., Srinivas, S. & Eckhart, W. (1992). Induction of c-jun protooncogene expression and transcription factor AP-1 activity by the polyoma virus middle-sized tumor antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 4972–6.
- Sihto, H., Kukko, H., Koljonen, V., Sankila, R., Böhling, T. & Joensuu, H. (2009). Clinical factors associated with Merkel cell polyomavirus infection in Merkel cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst* **101**, 938–45.
- da Silva Correia, J., Soldau, K., Christen, U., Tobias, P. S. & Ulevitch, R. J. (2001). Lipopolysaccharide is in close proximity to each of the proteins in its membrane receptor complex. transfer from CD14 to TLR4 and MD-2. *J Biol Chem* **276**, 21129–35.
- Sontag, E., Fedorov, S., Kamibayashi, C., Robbins, D., Cobb, M. & Mumby, M. (1993). The interaction of SV40 small tumor antigen with protein phosphatase 2A stimulates the map kinase pathway and induces cell proliferation. *Cell* **75**, 887–97.
- Stehle, T. & Harrison, S. C. (1996). Crystal structures of murine polyomavirus in complex with straight-chain and branched-chain sialyloligosaccharide receptor fragments. *Structure* **4**, 183–94.
- Stunz, L. L., Lenert, P., Peckham, D., Yi, A.-K., Haxhinasto, S., Chang, M., Krieg, A. M. & Ashman, R. F. (2002). Inhibitory oligonucleotides specifically block effects of stimulatory CpG oligonucleotides in B cells. *Eur J Immunol* **32**, 1212–22.
- Su, W., Liu, W., Schaffhausen, B. S. & Roberts, T. M. (1995). Association of Polyomavirus middle tumor antigen with phospholipase C-gamma 1. *J Biol Chem* **270**, 12331–4.
- Sweet, B. H. & Hilleman, M. R. (1960). The Vacuolating Virus, S.V.40. *Exp Biol Med* **105**, 420–427.
- Tabeta, K., Hoebe, K., Janssen, E. M., Du, X., Georgel, P., Crozat, K., Mudd, S., Mann, N., Sovath, S. & other authors. (2006). The Unc93b1 mutation 3d disrupts exogenous antigen presentation and signaling via Toll-like receptors 3, 7 and 9. *Nat Immunol* **7**, 156–64.
- Takeuchi, O. & Akira, S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* **140**, 805–20.
- Tal, G., Mandelberg, A., Dalal, I., Cesar, K., Somekh, E., Tal, A., Oron, A., Itskovich, S., Ballin, A. & other authors. (2004). Association between common Toll-like receptor 4 mutations and severe respiratory syncytial virus disease. *J Infect Dis* **189**, 2057–63.
- Tanimura, N., Saitoh, S., Matsumoto, F., Akashi-Takamura, S. & Miyake, K. (2008). Roles for LPS-dependent interaction and relocation of TLR4 and TRAM in TRIF-signaling. *Biochem Biophys Res Commun* **368**, 94–99.
- Teghanemt, A., Zhang, D., Levis, E. N., Weiss, J. P. & Gioannini, T. L. (2005). Molecular basis of reduced potency of underacylated endotoxins. *J Immunol* **175**, 4669–76.
- Termeer, C., Benedix, F., Sleeman, J., Fieber, C., Voith, U., Ahrens, T., Miyake, K., Freudenberg, M., Galanos, C. & Simon, J. C. (2002). Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells



- via toll-like receptor 4. *J Exp Med* **195**, 99–111.
- Teunissen, E. A., de Raad, M. & Mastrobattista, E. (2013).** Production and biomedical applications of virus-like particles derived from polyomaviruses. *J Control Release* **172**, 305–321.
- Thompson, M. R., Kaminski, J. J., Kurt-Jones, E. A. & Fitzgerald, K. A. (2011).** Pattern recognition receptors and the innate immune response to viral infection. *Viruses* **3**, 920–40.
- Thuringer, D., Hammann, A., Benikhlef, N., Fourmaux, E., Bouchot, A., Wettstein, G., Solary, E. & Garrido, C. (2011).** Transactivation of the epidermal growth factor receptor by heat shock protein 90 via Toll-like receptor 4 contributes to the migration of glioblastoma cells. *J Biol Chem* **286**, 3418–28.
- Tolstov, Y. L., Pastrana, D. V, Feng, H., Becker, J. C., Jenkins, F. J., Moschos, S., Chang, Y., Buck, C. B. & Moore, P. S. (2009).** Human Merkel cell polyomavirus infection II. MCV is a common human infection that can be detected by conformational capsid epitope immunoassays. *Int J cancer* **125**, 1250–6.
- Tsai, B., Gilbert, J. M., Stehle, T., Lencer, W., Benjamin, T. L. & Rapoport, T. A. (2003).** Gangliosides are receptors for murine polyoma virus and SV40. *EMBO J* **22**, 4346–55.
- Tsan, M.-F. & Gao, B. (2009).** Heat shock proteins and immune system. *J Leukoc Biol* **85**, 905–10.
- Tulic, M. K., Hurrelbrink, R. J., Prêle, C. M., Laing, I. A., Upham, J. W., Le Souef, P., Sly, P. D. & Holt, P. G. (2007).** TLR4 polymorphisms mediate impaired responses to respiratory syncytial virus and lipopolysaccharide. *J Immunol* **179**, 132–40.
- Tyndall, C., La Mantia, G., Thacker, C. M., Favaloro, J. & Kamen, R. (1981).** A region of the polyoma virus genome between the replication origin and late protein coding sequences is required in cis for both early gene expression and viral DNA replication. *Nucleic Acids Res* **9**, 6231–50.
- Upadhyay, M. & Vivekanandan, P. (2015).** Depletion of CpG Dinucleotides in Papillomaviruses and Polyomaviruses: A Role for Divergent Evolutionary Pressures. *PLoS One* **10**, e0142368.
- Urich, M., el Shemerly, M. Y., Besser, D., Nagamine, Y. & Ballmer-Hofer, K. (1995).** Activation and nuclear translocation of mitogen-activated protein kinases by polyomavirus middle-T or serum depend on phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* **270**, 29286–92.
- Vabulas, R. M., Ahmad-Nejad, P., Ghose, S., Kirschning, C. J., Issels, R. D. & Wagner, H. (2002).** HSP70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway. *J Biol Chem* **277**, 15107–12.
- Vacheron, S., Luther, S. A. & Acha-Orbea, H. (2002).** Preferential infection of immature dendritic cells and B cells by mouse mammary tumor virus. *J Immunol* **168**, 3470–6.
- Veldman, G. M., Lupton, S. & Kamen, R. (1985).** Polyomavirus enhancer contains multiple redundant sequence elements that activate both DNA replication and gene expression. *Mol Cell Biol* **5**, 649–58.
- Velupillai, P., Carroll, J. P. & Benjamin, T. L. (2002).** Susceptibility to polyomavirus-induced tumors in inbred mice: role of innate immune responses. *J Virol* **76**, 9657–63.
- Velupillai, P., Garcea, R. L. & Benjamin, T. L. (2006).** Polyoma virus-like particles elicit polarized cytokine responses in APCs from tumor-susceptible and -resistant mice. *J Immunol* **176**, 1148–1153.
- Velupillai, P., Sung, C. K., Andrews, E., Moran, J., Beier, D., Kagan, J. & Benjamin, T. (2012).** Polymorphisms in toll-like receptor 4 underlie susceptibility to tumor induction by the mouse polyomavirus. *J Virol* **86**, 11541–7.
- Viriyakosol, S., Tobias, P. S., Kitchens, R. L. & Kirkland, T. N. (2001).** MD-2 binds to bacterial lipopolysaccharide. *J Biol Chem* **276**, 38044–51.
- Vogt, M. & Dulbecco, R. (1960).** Virus-cell interaction with a tumor-producing virus. *Proc Natl Acad Sci* **46**, 365–370.
- Walczak, C. P. & Tsai, B. (2011).** A PDI family network acts distinctly and coordinately with ERp29 to facilitate polyomavirus infection. *J Virol* **85**, 2386–96.
- Wang, Y., Yang, Y., Liu, X., Wang, N., Cao, H., Lu, Y., Zhou, H. & Zheng, J. (2012).** Inhibition of clathrin/dynamin-dependent internalization interferes with LPS-mediated TRAM-TRIF-dependent signaling pathway. *Cell Immunol* **274**, 121–9.
- Wang, Z., Shao, Y., Li, C., Lv, Z., Wang, H., Zhang, W. & Zhao, X. (2016).** A  $\beta$ -integrin from sea cucumber *Apostichopus japonicus* exhibits LPS binding activity and negatively regulates coelomocyte apoptosis. *Fish Shellfish Immunol* **52**, 103–110.

- Watanabe, G., Howe, A., Lee, R. J., Albanese, C., Shu, I. W., Karnezis, A. N., Zon, L., Kyriakis, J., Rundell, K. & Pestell, R. G. (1996). Induction of cyclin D1 by simian virus 40 small tumor antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 12861–6.
- Wesche, H., Henzel, W. J., Shillinglaw, W., Li, S. & Cao, Z. (1997). MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity* **7**, 837–47.
- White, M. K., Gordon, J. & Khalili, K. (2013). The Rapidly Expanding Family of Human Polyomaviruses: Recent Developments in Understanding Their Life Cycle and Role in Human Pathology. *PLoS Pathog* **9** (T. C. Hobman, Ed.).
- Wilks, J., Lien, E., Jacobson, A. N., Fischbach, M. A., Qureshi, N., Chervonsky, A. V & Golovkina, T. V. (2015). Mammalian Lipopolysaccharide Receptors Incorporated into the Retroviral Envelope Augment Virus Transmission. *Cell Host Microbe* **18**, 456–62.
- Wright, S. D., Ramos, R. A., Tobias, P. S., Ulevitch, R. J. & Mathison, J. C. (1990). CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* **249**, 1431–3.
- Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Sanjo, H., Takeuchi, O., Sugiyama, M., Okabe, M. & other authors. (2003a). Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* **301**, 640–3.
- Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Uematsu, S., Hoshino, K., Kaisho, T., Takeuchi, O., Takeda, K. & Akira, S. (2003b). TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat Immunol* **4**, 1144–50.
- Yamamoto, M., Yamazaki, S., Uematsu, S., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Kuwata, H., Takeuchi, O. & other authors. (2004). Regulation of Toll/IL-1-receptor-mediated gene expression by the inducible nuclear protein IkappaBzeta. *Nature* **430**, 218–22.
- Yoo, W., Martin, M. E. & Folk, W. R. (1991). PEA1 and PEA3 enhancer elements are primary components of the polyomavirus late transcription initiator element. *J Virol* **65**, 5391–400.
- You, J., O'Hara, S. D., Velupillai, P., Castle, S., Levery, S., Garcea, R. L. & Benjamin, T. (2015). Ganglioside and Non-ganglioside Mediated Host Responses to the Mouse Polyomavirus. *PLoS Pathog* **11**, e1005175.
- Yu, B. & Wright, S. D. (1996). Catalytic properties of lipopolysaccharide (LPS) binding protein. Transfer of LPS to soluble CD14. *J Biol Chem* **271**, 4100–5.
- Zanoni, I., Ostuni, R., Marek, L. R., Barresi, S., Barbalat, R., Barton, G. M., Granucci, F. & Kagan, J. C. (2011). CD14 controls the LPS-induced endocytosis of Toll-like receptor 4. *Cell* **147**, 868–80.
- Žila, V., Difato, F., Klimova, L., Huerfano, S. & Forstova, J. (2014). Involvement of microtubular network and its motors in productive endocytic trafficking of mouse polyomavirus. *PLoS One* **9**.